VALPROINSÄURE – UNTERSUCHUNGEN ZUR PHARMA-KOKINETIK BEI PATIENTEN UNTER VERWENDUNG STABILER ISOTOPE

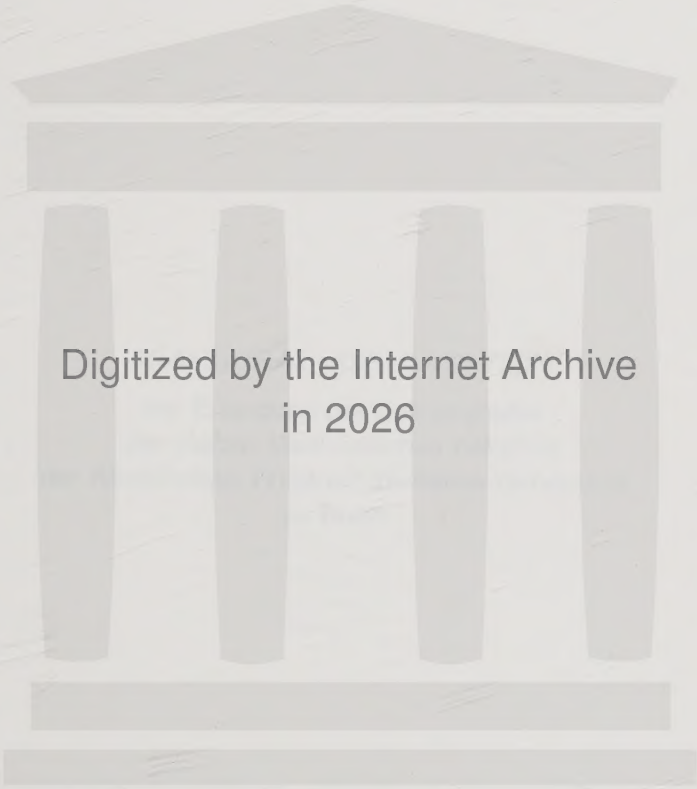
INAUGURAL–DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von

BARBARA JANCIK
aus Bochum

BONN 1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546506_0047

VALPROINSÄURE – UNTERSUCHUNGEN ZUR PHARMAKOKINETIK BEI PATIENTEN UNTER VERWENDUNG STABILER ISOTOPE

INAUGURAL–DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von

BARBARA JANCIK
aus Bochum

BONN 1980

angefertigt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. H.J. Dengler
2. Gutachter: Prof. Dr. U. Schwabe

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. H.J. Dengler

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Druck: Dissertationsdruck M. Wehle, 5305 Witterschlick/Bonn

Meinen Eltern gewidmet

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite

1. Aufgabenstellung dieser Arbeit 5
2. Das antikonvulsive Medikament Valproinsäure 7
   2.1. Geschichte 7
   2.2. Chemie 7
   2.3. Galenische Zubereitungsformen in der BRD 8
   2.4. Indikationen und Wirksamkeit 8
   2.5. Dosierung 9
   2.6. Wirkungsweise 1o
   2.7. Nebenwirkungen 11
   2.8. Therapeutische Breite 11
   2.9. Pharmakokinetik der Valproinsäure 12
      2.9.1. Resorption und Bioverfügbarkeit 12
      2.9.2. Verteilungsvolumen 13
      2.9.3. Elimination 13
   2.1o. Eiweißbindung 14
   2.11. Metabolismus 14
3. Experimenteller Teil 16
      3.1.1. Definition des Begriffes "stabiles Isotop" 16
      3.1.2. Synthese der unmarkierten Valproinsäure 16
      3.1.3. Synthese des internen Standards, der D_{14}-Valproinsäure 17
      3.1.4. Synthese der D_4-Valproinsäure 17
   3.2. Extraktion der Valproinsäure und ihrer markierten Varianten aus Plasma zur massenspektrometrischen Bestimmung ... 19
   3.3. Grundlagen zur quantitativen massenspektrometrischen Bestimmung 2o
      3.3.1. Gaschromatographie 2o
      3.3.2. Massenspektrometrie 2o
      3.3.3. Kombinierte Gaschromatographie-Massenspektrometrie 21
   3.4. Verhalten der Valproinsäure und ihrer markierten Varianten im Gaschromatographen 22

3.5. Massenspektrometrisches Verhalten des Valproinsäuremethylesters und seiner markierten Varianten 23
3.6. Einstellung des LKB 2091 GC/MS-Systems für die quantitative Messung von Valproinsäure und ihrer markierten Varianten 25
3.6.1. Gaschromatographie-Bedingungen 25
3.6.2. Massenspektrometer-Bedingungen 25
3.7. Berechnung der Valproinsäurekonzentrationen im Plasma 27
3.8. Berechnung der D_4-Valproinsäurekonzentration im Plasma ... 28
3.9. Erstellung der Eichkurve der D_4-Valproinsäure 28
3.10. Erstellung der Eichkurve der Valproinsäure 30
3.11. Prüfung auf Richtigkeit 31
4. Probandenversuch zum Ausschluß eines Isotopeneffektes 34
5. Valproinsäuredispositionen bei Patienten mit epileptischem Anfallsleiden 36
5.1. Auswahl der Patienten 36
5.2. Versuchsbeschreibung 41
6. Pharmakokinetik der Valproinsäure 44
7. Ergebnisse 47
8. Zusammenfassung 53
9. Literaturverzeichnis 55

1. Aufgabenstellung dieser Arbeit

In verschiedenen Veröffentlichungen wurde beschrieben, daß die Serumspiegel (Hulshoff, 1977; Bowdle, 1979) und die Halbwertszeiten (Richens, 1976) Perrucca, 1978) der Valproinsäure häufig erniedrigt vorgefunden wurden, wenn diese in Kombination mit anderen Antiepileptika gegeben wurde. Zurückgeführt wurde dieser Effekt auf eine durch die Comedikation bewirkte Induktion der am Abbau der Valproinsäure beteiligten Leberenzyme (Bowdle, 1979; Perrucca, 1978; Richens, 1976). Eine Änderung der Bioverfügbarkeit der Valproinsäure konnte von Perrucca, 1978, ausgeschlossen werden.

Bisher konnte die Änderung der Kinetik der Valproinsäure bei Kombinationstherapien nur überprüft werden, wenn

1. die Kinetik nach zusätzlicher Gabe einer Einzeldosis Valproinsäure an Patienten gemessen wurde, welche unter einer Dauertherapie mit anderen Antikonvulsiva standen (Perrucca, 1978)

oder

2. während eines Dosisintervalls aus abfallenden Plasmakonzentrationen, gemessen über einen Zeitraum von nur 9 Std., eine Kinetik errechnet wurde (Richens, 1976).

Gram wies in seiner Studie (1979) eine positive Korrelation zwischen Höhe des Valproinsäurespiegels und Reduktion der Anfallszahl nach, das heißt, daß ein positiver Zusammenhang zwischen der Höhe des Serumspiegels und der Wirksamkeit der Valproinsäure besteht. Daher ist es von evidenter Bedeutung, mehr über das pharmakokinetische Verhalten der Valproinsäure bei Patienten mit epileptischen Anfallsleiden zu erfahren, welche eine Valproinsäure-Monotherapie oder außer der Valproinsäure noch weitere Antiepileptika erhalten. Um genauere Daten über den Einfluß der Comedikation auf die Kinetik der Valproinsäure zu erhalten, sollten folgende Bedingungen erfüllt sein:

1. Die Messungen der pharmakokinetischen Parameter der Valproinsäure sollten bei Patienten mit epileptischen Anfallsleiden erst nach längerer Einnahme der Valproinsäure und der Comedikation und dann während der Therapie ohne Unterbrechung dieser, d.h. unter wirklichen Steady-State Bedingungen, erfolgen.

2. Die Messungen sollten über einen genügend langen Zeitraum erfolgen. Als Meßzeit werden im allgemeinen 3 - 4 Halbwertszeiten angegeben, d.h. im Falle der Valproinsäure, deren Halbwertszeiten bei gesunden Probanden zwischen 12 - 16 Std. angegeben werden, sollte mindestens über einen Zwischenraum von 48 Std. gemessen werden.

3. Um einen Vergleichskollektiv zu erhalten, sollte die Kinetik der Valproinsäure bei Patienten, welche mit Valproinsäure als einzigem Medikament behandelt werden, analog gemessen werden.

Der erste Teil dieser Arbeit bestand in der Entwicklung eines Verfahrens, welches diese Messungen gestattet: Eine mit stabilen Isotopen markierten Variante der Valproinsäure, die sich hinsichtlich der Wirkung und des kinetischen Verhaltens von der unmarkierten nicht unterscheidet, wurde synthetisiert. Nach der Entwicklung eines geeigneten Extraktionsverfahrens wurde diese markierte Variante neben der unmarkierten Valproinsäure mit Hilfe einer D_{14}-Valproinsäure als internem Standard in einem GC-MS-System quantitativ gemessen. Dieses Meßverfahren weist eine hohe Empfindlichkeit und Spezifität auf und erlaubt somit die Messung über einen genügend langen Zeitraum.

Der zweite Teil dieser Arbeit bestand in der Anwendung dieses Meßverfahrens. Zur Messung der Pharmakokinetik der Valproinsäure wurde Patienten unter Fortführung ihrer normalen Therapie die markierte Valproinsäure einmalig an Stelle einer kommerziellen handelsüblichen Dosis gegeben; die Blutspiegel wurden nach der entwickelten Methode bestimmt. Aus den Meßdaten konnten alle benötigten pharmakokinetischen Parameter bestimmt werden.

2. Das antikonvulsive Medikament Valproinsäure

2.1. Geschichte

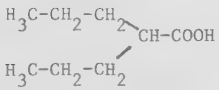
1881 berichtete Burton schon über die Synthese der Valproinsäure, doch der erste Bericht über die pharmakologische Wirksamkeit erschien 1963 von Meunier. Er entdeckte durch einen Zufall, indem er Valproinsäure als organisches Lösungsmittel für ein potentielles Antiepileptikum benutzte, die antikonvulsive Wirkung dieser Verbindung bei Kaninchen und Mäusen.

1964 veröffentlichte Carraz den ersten Bericht über die klinische Anwendung und Wirksamkeit beim Menschen, welches bald von zahlreichen Autoren bestätigt wurde (Bonnin 1964, Matthes 1971, Kruse 1971, Meinhardi 1971, Völzke 1973 u.v.a.)

Seit 1967 ist das Natrium-Salz der Valproinsäure in Frankreich im Handel und wurde in den folgenden Jahren in Spanien, Italien, Großbritannien, Belgien, Holland, Schweiz und seit 1973 auch in Deutschland zur Behandlung freigegeben.

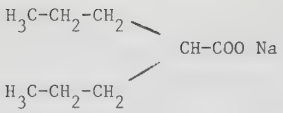
2.2. Chemie

Valproinsäure (Synonyma Di-n-propylessigsäure, 2-n-Propylpentansäure, 2-n-Propylvaleriansäure) ist eine einfache, symmetrisch verzweigte kurzkettige Fettsäure



Molekulargewicht: 144 Summenformel: $C_8H_{16}O_2$

Die Valproinsäure ist eine farblose Flüssigkeit mit einem Siedepunkt von 221 - 222°, schwer löslich in Wasser, leicht löslich in Alkohol und den üblichen organischen Lösungsmitteln. Valproinsäure wird meist als Natrium-Salz verabreicht.



Molekulargewicht: 166 Summenformel: $C_8H_{15}O_2Na$

Das Natrium-Salz der Valproinsäure ist ein weißes kristallines geruchloses Pulver, leicht löslich in Wasser, hygroskopisch, löslich in Alkohol, jedoch schwer löslich in vielen organischen Lösungsmitteln, wie beispielsweise Aceton, Benzol, Cyclohexan, Dichlormethan und Chloroform.

2.3. Galenische Zubereitungsformen in der BRD

Valproinsäure wird sowohl als Säure (Convulex^R, Fa. Byk-Gulden), als aber auch als Na-Salz (Ergenyl^R, Fa. Labaz, Orfiril^R, Fa. Desitin) verabreicht.

Sie wird in magenlöslicher Form und magensaftresistenter bzw. dünndarmlöslicher Form vertrieben.

Außer der normal resorbierbaren Form werden auch Retard-Präparate angeboten.
Ein i.v.-Präparat ist in der BRD nicht im Handel.

2.4. Indikationen und Wirksamkeit

Zahlreiche Berichte über die Wirksamkeit der Valproinsäure liegen bisher vor; teilweise differieren diese erheblich, was unter anderem auf verschiedene Auswahlkriterien der Patienten und unterschiedliche Dosierungsmengen (Lagenstein, 1977) zurückzuführen ist. Nur drei der vielen Studien wurden als Doppelblindversuche durchgeführt (Meinhardi, 1971; Richens, 1976; Suzuki, 1972).

Die Mehrzahl der Autoren berichtete über beste Ergebnisse bei überwiegend genetisch bedingten, primär generalisierten Epilepsien mit dem Auftreten bilateral-synchroner steiler Potentiale im EEG. Einzuordnen in diese Gruppe sind die typischen Absencen des pyknoleptischen und juvenilen Petit-Mal, der bilaterale massive Myoklonus (Impulsiv-Petit-Mal), die Grand-Mal-Epi-

lepsien vom Aufwachtyp und der primär generalisierte sogen. Typ des myoklonisch-astatischen Petit-Mal oder Lennox-Gastaut-Syndrom (Fröscher, 1978; Groh, 1976; Haigh, 1975; Jeavons, 1974; Ketz, 1971; Köhler, 1975; Kugler, 1974; Matthes, 1971; Penin, 1973; Penin, 1974; Völzke, 1973).

Nach Kugler und Empt liegt der Anteil der erfolgreichen Behandlungen in dieser Gruppe bei 7o %. Innerhalb dieser Gruppe sind es die typischen Absencen, bei denen die Valproinsäure die höchste Wirksamkeit erreicht; sie wird bis zu 1oo % angegeben (Bergamini, 197o).

Als Monotherapie hat Valproinsäure besondere Wirkung bei primär generalisierten Anfällen vom Typ des Grand-Mal (Förster, 1972; Richens, 1976, Richens, 1976; Schlack, 1974).

Weniger gute Ergebnisse bei den sekundär generalisierten Epilepsien (BNS-Krämpfe bzw. West-Syndrom, einem Teil der zum myoklonisch-astatischen Petit-Mal bzw. Lennox-Gastout-Syndrom gehörenden Anfälle, Enzephalopathien mit Epilepsie wie das Unverricht-Lundborg-Syndrom) und bei partiellen Epilepsien (z.B. Jackson-Anfälle, Adversiv-Anfälle, Psychomotorische-Anfälle, fokal beginnende Anfälle vom Grand-Mal-Typ (Fröscher, 1978; Förster, 1972; Groh, 1976; Harwood, 1976; Hassan, 1976; Kugler, 1974; Lance, 1977; Malek, 1975; Matthes, 1971; Penin, 1973; Schlack, 1974; Schweizer, 1973; Simon, 1975; Völzke, 1973).

2.5. Dosierung

Bei der Valproinsäure besteht ein sehr großer Dosierungsbereich. Zurückzuführen ist dieser

1. auf Anwendung der Valproinsäure in einer Mono- oder einer Kombinationstherapie;
2. auf das verschiedene Ansprechen der einzelnen Anfallsformen auf Valproinsäure (Schlack, 1974);
3. auf die verschiedene Verträglichkeit bei einer Kombinationstherapie und die fehlende toxische Obergrenze (Schlack, 1974);
4. auf interindividuelle Unterschiede der Dosis/Serumspiegel-Beziehung (Fröscher, 1978).

Im Kindesalter liegt die empfohlene Dosis zwischen 15 - 6o mg/kg/die (Simon und Penry, 1975) bzw. 25-1oo-15o mg/kg/die (Schlack, 1974) bei Valproinsäure Monotherapie, dies entspricht den Empfehlungen anderer Autoren, welche die Tagesdosis mit 2oo-24oo-3ooo mg/die angeben (Förster, 1972; Matthes, 1977; Matthes, 1971; Ritz, 1973; Simon und Penry, 1975; Völzke, 1973).

Die verwandte Dosis im Erwachsenenalter liegt zwischen 2oo-3ooo mg/die (Fröscher, 1976; Matthes, 1971; Meinardi, 1974; Penin, 1973, 1974; Schäfer, 1974; Scollo-Lavizzari, 197o; Simon, 1975; Völzke, 1973).

Aufgrund der kurzen Halbwertzeit der Valproinsäure wird die Zahl der empfohlenen Tagesdosen mit 3 - 4 angegeben (Fröscher, 1976).

2.6. Wirkungsweise

Die genaue Wirkungsweise der Valproinsäure ist bisher noch nicht im Detail aufgeklärt. Es wird ein Einfluß auf den Stoffwechsel der γ-Aminobuttersäure (GABA) diskutiert.

Die GABA ist eine physiologische Hemmsubstanz der prä- und postsynaptischen Entladungen; eine Senkung des GABA-Spiegels kann im Tierexperiment zu einer Krampfentstehung führen. Godin et al. wiesen als erste im Tierversuch nach, daß die Valproinsäure eine Erhöhung der GABA bewirkt, sie führten dies auf eine Hemmung der GABA-Transaminase, einem Enzym, das an der Umwandlung der GABA in die α-Ketoglutarsäure beteiligt ist, zurück (Godin, 1969). Die Arbeiten von Simler, 1973; Harvey, 1975; Anlezark, 1976; bestätigen dies.

Außerdem haben Harvey, 1975; Anlezark, 1976, und Sawaya 1975, auch die Hemmung der Succin-Semialdehyd-Dehydrogenase (SSAD), des anderen, für den Katabolismus der GABA verantwortliche Enzyms, nachgewiesen.

Diese Effekte der Valproinsäure wurden jedoch bisher nur im Tierversuch nachgewiesen und dort auch nur mit Dosen erzielt, die in der Praxis nie erreicht werden (Anlezark, 1976; Sawaya, 1975).

2.7. Nebenwirkungen

Valproinsäure wird im allgemeinen recht gut toleriert. Die häufigsten bisher beschriebenen Nebenwirkungen sind gastrointestinale Beschwerden, wie Übelkeit und Erbrechen, die nach Simon und Penry (1975) bei 16 % der mit Valproinsäure behandelten Patienten auftraten, jedoch meist nur vorübergehender Art waren, weshalb manche Autoren vorschlugen, sich mit der Dosis langsam einzuschleichen (Simon und Penry, 1975). Außerdem wurden zur Vermeidung dieser Beschwerden von der Pharma-Industrie magensaftresistente, aber dünndarmlösliche Valproinsäure-Dragees entwickelt.

Ein Einfluß auf das Körpergewicht wurde auch beobachtet, sowohl Gewichtszunahmen als auch Abnahmen wurden beschrieben. Kruse (1974) fand in einer Gruppe von 164 Patienten bei 9,5 % eine Appetitsteigerung und bei 12 % eine Appetitverminderung, jeweils verbunden mit Gewichtsveränderungen. Völzke und Doose (1973) fanden bei 4 % von 116 Patienten eine Appetitsteigerung, verbunden mit Gewichtszunahme.

Verschiedentlich wurden Alopezien beobachtet, bisher jedoch nie bei einer Monotherapie, sondern nur, wenn Valproinsäure in Kombination mit einem anderen Antiepileptikum gegeben wurde. Diese Alopezien traten dann auch nur sporadisch auf (Kugler, 1973; Völzke und Doose, 1973; Klotz, 1974; Penin, 1974)

Über Thrombopenien und Thrombopathien, verbunden mit klinischen Symptomen wie Nasenbluten und Blutbeimengungen im Stuhl, berichteten Penin und Köhler (1974).

Über einen Anstieg der alkalischen Phosphatase im Serum berichteten Suzuki et al. (1972), aber nur, wenn Valproinsäure in Verbindung mit einem anderen Antiepileptikum gegeben wurde.

Minimale SGOT-Anstiege, die vorübergehender Art waren, wurden von Völzke und Doose (1973) beobachtet.

2.8. Therapeutische Breite

Über die therapeutische Breite der Valproinsäure ist bisher wenig bekannt.

Bis jetzt wurde kein Todesfall beschrieben, der direkt mit der Valproinsäure korrelierbar wäre. Die höchste bisher bekannte eingenommene Menge Valproinsäure waren 36 g, die von einem 2o-jährigen Mädchen bei einem Selbstmordversuch zusammen mit 1 g Phenobarbital und 3oo mg Diphenylhydantoin eingenommen wurden. Die Patientin befand sich vier Stunden nach Einnahme in einem tiefen Koma, gelangte dann aber recht schnell zu Bewußtsein und wurde einen Tag darauf entlassen (Simon und Penry, 1975).

2.9. Pharmakokinetik der Valproinsäure

2.9.1. Resorption und Bioverfügbarkeit

Valproinsäure wird nach oraler Gabe in Tablettenform sehr schnell und nahezu vollständig resorbiert (Ferrandes, 1973; Schobben, 1975; Loiseau, 1975; Mortel, 1976; Meijer, 1976; Klotz, 1977; Perrucca, 1978). Maximale Plasmakonzentrationen werden nach Verabreichung der magenlöslichen Tablette nach 1 - 4 Std., in den meisten Fällen nach 1 - 2 Std. erreicht. Nach Gabe der dünndarmlöslichen galenischen Zubereitung ist die mittlere Resorptionszeit von 2 Std. auf 4,5 Std. verlängert, maximale Plasmaspiegel wurden nach 7,5 Std. erreicht.

Die absolute Bioverfügbarkeit, getestet durch einen Vergleich von einer intravenösen Lösung zu einer kommerziellen Tablette ist nahezu vollständig (Klotz, 1977; Perrucca, 1978), woraus unter anderem geschlossen werden kann, daß kein nennenswerter First-Pass-Effect in der Leber oder im Darm auftritt (Gugler, 1979).

Auch beim Vergleich einer mit freier Valproinsäure gefüllten Kapsel zu einer dünndarmlöslichen Tablette des Natriumsalzes wurde kein Unterschied in der Bioverfügbarkeit beobachtet (Ölkers, 1977).

Zusammenfassend kann man sagen, daß die Bioverfügbarkeit in allen bisher auf dem Markt vertriebenen galenischen Zubereitungen gleich ist. Der Unterschied zwischen dem bisher untersuchten Präparaten besteht nur in dem Ort und der Zeit der Freisetzung.

2.9.2. Verteilungsvolumen

Das Verteilungsvolumen der Valproinsäure ist verhältnismäßig klein; beschrieben wurden Verteilungsvolumina zwischen o,1 - o,4 l/kg (Loiseau, 1975; Simon und Penry, 1975; Klotz, 1977; Gugler, 1977; Perrucca, 1978). Zurückzuführen ist dieses verhältnismäßig kleine Verteilungsvolumen wahrscheinlich auf die hohe Eiweißbindung, da nur der ungebundene Teil der Valproinsäure sich in den verschiedenen Geweben verteilen kann.

2.9.3. Elimination

Plasmahalbwertszeit und Plasmaclearance

Die Plasmahalbwertszeit beträgt bei gesunden Probanden und bei Patienten, welche Valproinsäure als einziges Antiepileptikum erhalten, zwischen 8 - 16 Std. Schobben (1975) gibt die Halbwertszeit zwischen 8 - 15 Std., Johannessen (1977) mit 14 Std. bei Patienten an. Bei gesunden Probanden wird die Halbwertszeit von Loiseau (1975) mit 8 $\pm$ 1o Std., von Klotz (1977) mit 12,2 $\pm$ 3,7 Std., von Gugler (1977) mit 15,9 $\pm$ 2,6 Std. angegeben.

Die Plasmaclearance beträgt im Mittel 5 - 1o ml/min (Schobben, 1975; Klotz, 1977; Gugler, 1977).

Die Plasmahalbwertszeit nach einmaliger Gabe war mit der nach dreiwöchiger Einnahme identisch, was darauf hindeutet, daß auch bei Einnahme der Valproinsäure über einen längeren Zeitraum weder eine Sättigung, noch eine Autoinduktion auftreten (Gugler, 1977).

Renale Clearance

Die renale Clearance der Valproinsäure spielt eine untergeordnete Rolle, da nur ein sehr geringer Anteil als unveränderte Valproinsäure ausgeschieden wird. Gugler (1977) gibt den Anteil der unveränderten Valproinsäure, welche im Urin ausgeschieden wird, mit 1,8 % nach einmaliger und mit 3,2 % nach mehrmaliger Gabe von Valproinsäure an.

2.1o. Eiweißbindung

Valproinsäure wird in einem sehr hohen Maße an Plasmaprotein gebunden, im Durchschnitt etwa 9o % (Jordan, 1976; Portratz, 1976; Klotz, 1977; Gugler, 1978; Löscher, 1978; Patel, 1979).

Die Proteinbindung variiert bei niedrigen Plasmakonzentrationen in Patienten ohne renale oder hepatische Begleiterkrankung und bei Monotherapie kaum, bei höheren Plasmakonzentrationen $>$ 1oo µg/ml ist die Eiweißbindung jedoch reduziert. Der freie Anteil der Valproinsäure kann um 5o % ansteigen (Gugler, 1979). Die Verminderung der Eiweißbindung ist verbunden mit einer niedrigeren Gesamtkonzentration, welches eine Erklärung für die nicht lineare Beziehung zwischen Dosis und Plasmakonzentrationen sein könnte (Gram, 1979).

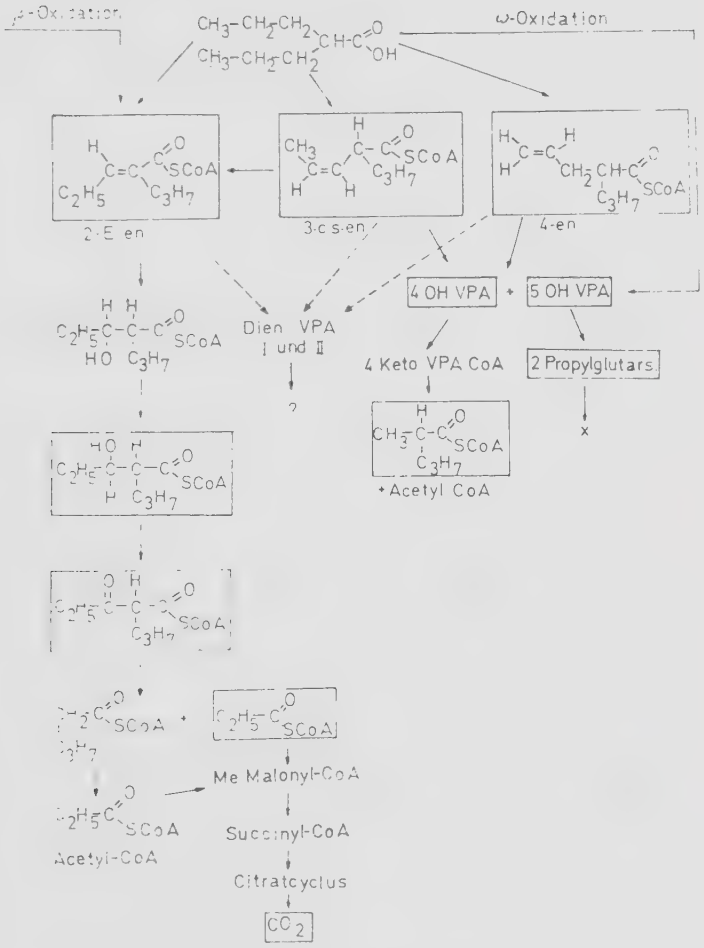
In Patienten mit einer Niereninsuffizienz (Gugler, 1978) Lebercirrhose und akuter viraler Hepatitis (Klotz, 1978) wurde eine verminderte Eiweißbindung gefunden, während in einer anderen Studie bei Patienten mit akuter Hepatitis keine großen Veränderungen der Eiweißbindung gefunden wurde (Gugler, 1979).

Valproinsäure wird außerdem von verschiedenen in der Natur vorkommenden freien Fettsäuren (auch in physiologischen Konzentrationen) aus der Eiweißbindung verdrängt (Patel, 1979). Andere Antikonvulsiva, wie zum Beispiel Phenobarbital, Phenytoin und Carbamazepin haben keinen Einfluß auf die Eiweißbindung der Valproinsäure (Patel, 1979).

2.11. Metabolismus

Der Abbau der Valproinsäure erfolgt im wesentlichen über vier Hauptwege: die Glukuronisierung, die Beta-Oxidation, die $Omega_1$-Oxidation und die $Omega_2$-Oxidation. Die einzelnen Wege und die Hauptmetabolite sind in Abb. 1 schematisch dargestellt.

Abb. 1 Abbauwege der Valproinsäure



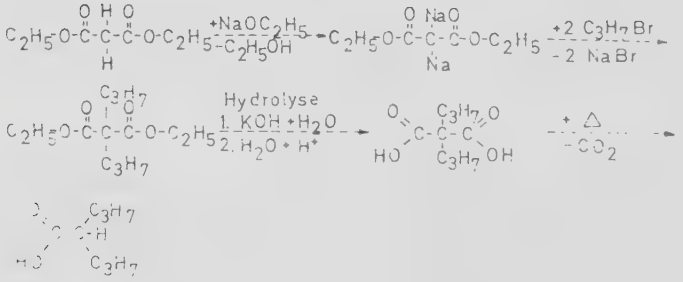
3. Experimenteller Teil

3.1.1. Definition des Begriffes "stabiles Isotop"

Isotope sind Atome ein und desselben Elementes, die sich durch die Zahl ihrer Neutronen im Kern und dadurch hinsichtlich ihrer Masse unterscheiden. Bei stabilen Isotopen ist der Kern, wie der Name schon sagt, stabil, das heißt, er zerfällt n i c h t unter Aussendung radioaktiver Strahlen. Chemisch verhalten sich Isotope eines Elementes gleich, denn sie tragen die gleiche Anzahl von Elektronen in ihrer Hülle.

3.1.2. Synthese der unmarkierten Valproinsäure

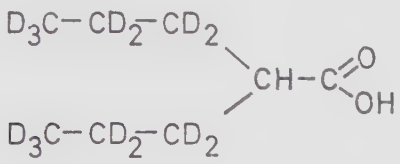
Die unmarkierte Valproinsäure wurde durch Alkylierung von Malonsäurediäthylester in Na-Äthanolat mit n-Propylbromid und nachfolgender Verseifung und Decarboxylierung hergestellt. Gearbeitet wurde nach den Arbeitsanleitungen des Organikums (1977) S. 518, 52o, 6oo.



3.1.3. Synthese des internen Standards, der D_{14}-Valproinsäure

Die D_{14}-Valproinsäure wurde nach dem gleichen Synthese-Prinzip wie die unmarkierte Valproinsäure hergestellt, nur wurde an Stelle des n-Propylbromids D_7Propylbromid (98 Atom % D; Merck, Sharp & Dohme Canada Limited) eingesetzt.

Die entstandene markierte Valproinsäure hatte folgende Strukturformel:



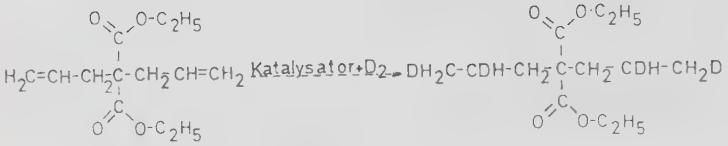
Einwaage: 8,1 g Malonsäurediäthylester
9,9 g D_7-Propylbromid

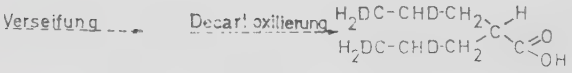
Ausbeute nach zweimaliger Destillation: o,15 g reine D_{14}-Valproinsäure

3.1.4. Synthese der D_4-Valproinsäure

Die D_4-Valproinsäure wurde durch eine katalytische Deuterierung des Diallylmalonsäurediäthylesters hergestellt. Als Katalysator fungierte Tris(triphenyl-phosphin)-rhodium(I)-chlorid, der sogenannte Wilkinson-Katalysator (Osborn, 1966).

Zur Deuterierung wurde in eine Mischung von Diallylmalonester, Benzol und Katalysator das Deuterium unter einem Druck von 3o bar in einen Autoklaven eingeleitet. Nach der Deuterierung wurde der D_4-markierte Malonester, wie zuvor der unmarkierte und der D_{14}-markierte Malonester, verseift und decarboxyliert.


Katalysator+D2


Verseifung
Decarboxilierung

3.2. Extraktion der Valproinsäure und ihrer markierten Varianten aus Plasma zur massenspektrometrischen Bestimmung

1 ml Plasma wird in ein 12-ml-Rundbodenglas pipettiert und 25 µl (≙ 25 µg) der methanolischen Lösung des internen Standards (1 mg D_{14}-Valproinsäure/ml MeOH) mit einer Mikrolitherspritze zugegeben. Nach ca. 1o sec. Mischen mit einem Whirlmix werden 3 ml Cyclohexan hinzugegeben und die Mischung 3o sec. gevortexed und 5 min bei 4ooo U/min zentrifugiert. Die obere Phase, welche das Cyclohexan und die extrahierten Neutralfette enthält, wird durch Absaugen mit einer Wasserstrahlpumpe verworfen. Die untere Phase wird mit 1 ml einer o,5 n HCl angesäuert. Zur Extraktion der Säuren werden 5 ml einer organischen Lösung, bestehend aus Cyclohexan, Chloroform und Methanol (im Verhältnis 25:25:1), hinzugegeben, 3o sec. gevortexed und 5 min bei 4ooo U/min zentrifugiert. Die obere Phase wird verworfen, die untere organische Phase wird in ein 12-ml-Rundbodenglas überpipettiert. Zu dieser Phase werden 2 ml einer 1 n NaOH gegeben, wiederum 3o sec. gevortexed und 5 min. zentrifugiert. Die obere alkalische Phase, welche das Na-Salz der Valproinsäure enthält, wird vorsichtig in ein 12-ml-Spitzbodenglas überführt. Durch Ansäuern mit einer 3 n HCl wird aus dem Na-Salz die Säure wieder freigesetzt. Diese wird dann mit Dichlormethan extrahiert. Nach 2o sec. langem Vortexen und Zentrifugieren dieser Mischung wird die obere wässrige Phase verworfen und die untere Dichlormethan-Phase in ein weiteres Spitzbodenglas überpipettiert. In diese Phase wird zur Veresterung der extrahierten Valproinsäure Diazomethan, welches aus N-Methyl-N-Nitroso-p-Toluolsulfonamid gewonnen wird (Methode nach Schlenk und Gellerman, 196o), eingeleitet, bis die Phase gelb wird. Diese Mischung wird o,5 Std. stehengelassen und dann unter Stickstoff bis zur ungefähr zur Hälfte eingeengt. 1 µl dieser Lösung wird in das GC/MS-System eingespritzt.

3.3. Grundlagen zur quantitativen massenspektrometrischen Bestimmung

3.3.1. Gaschromatographie

Die Gaschromatographie ist ein Trennverfahren, welches auf der Verteilung eines Substanzgemisches zwischen einer stationären Phase und einer bewegten Gasphase beruht. Die stationäre Phase kann entweder fest sein oder aus einer hochsiedenen Flüssigkeit bestehen, welche auf ein Trägermaterial aufgebracht wird (Kaiser, 1973). Der Gasstrom führt die Substanzen durch die Kolonne, wo sie sich entsprechend ihres Verteilungskoeffizienten zwischen Gas und Flüssigkeit verteilen. Die einzelnen Komponenten des Gemisches werden unterschiedlich lange in der Phase zurückgehalten und dadurch getrennt. Die getrennten Stoffe werden am Ende der Kolonne durch ein geeignetes Detektionssystem gemessen und registriert. Die Identifizierung erfolgt anhand der Retentionszeiten, welche mit Hilfe von Referenzsubstanzen ermittelt werden.

3.3.2. Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist ein analytisches Verfahren, bei dem eine zu untersuchende Substanz im gasförmigen Zustand unter hohem Vakuum (10^{-7} Torr) ionisiert und fragmentiert wird (Millard, 1978; Spiteller, 1966; Seibl, 1974; Waller, 1972). Nach der Ionisation, welche in dem von uns verwendeten Gerät durch Ionenstoß erfolgt, werden die geladenen Partikel in einem elektrischen Feld beschleunigt, in einem Magnetfeld nach ihrem Masse-Ladungsverhältnis (m/z) abgelenkt und entsprechend ihrer Intensität registriert.

Die Grundgleichung für magnetische Sektormassenspektrometer lautet:

$$m/z = \frac{B^2 R^2}{2\,V}$$

Sie gibt die Beziehung zwischen dem Masse-Ladungsverhältnis (m/z) zur magnetischen Feldstärke (B), dem Radius der Kreisbahn des Ions im Magnetfeld (R) und der Beschleunigungsspannung (V) an, wobei der Radius durch das Trennrohr des Massenspektrometers festgelegt wird, die magnetische Feldstärke (B) und die Beschleunigungsspannung (V) variabel sind.

Durch Änderung des magnetischen Feldes und Konstanthaltung der Beschleunigungsspannung kann jedes Bruchstück eines Moleküls nacheinander auf den Detektor fokussiert werden. So entsteht das Massenspektrum eines Moleküls. Aus dem Massenspektrum ist die Identifizierung und unter Umständen die Strukturanalyse einer Verbindung möglich.

Bei konstantem Magnetfeld und Einstellung der Beschleunigungsspannung auf einen konstanten Wert kann ein ausgewähltes Ion auf dem Detektor fokussiert und quantitativ gemessen werden. Dieses Verfahren ist bekannt als Single Ion Detection, Abk. S I D .

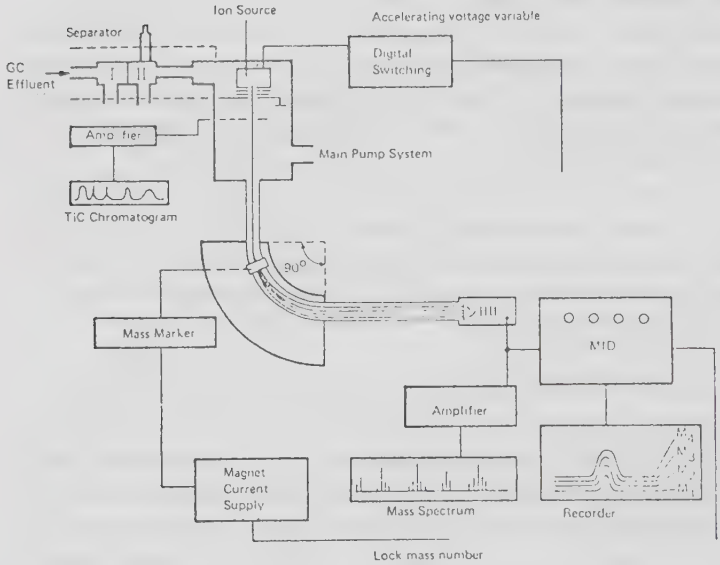
Bei schneller Umschaltung der Beschleunigungsspannung zwischen vorgewählten Werten können mehrere Ionen in kurzer Zeit nacheinander vom Detektor erfaßt und quantitativ gemessen werden. Dieses Verfahren wird Multiple Ion Detection, Abk. M I D genannt.

Der Vorteil dieses Verfahrens besteht zum einen in der hohen Spezifität und zum anderen in der sehr hohen Empfindlichkeit, welche über den Nanogrammbereich (10^{-9} g) bis in den Picogrammbereich (10^{-12}) hineingeht. Die hohe Empfindlichkeit gegenüber der herkömmlichen Massenspektrometrie beruht darauf, daß auf den Kollektor während der gesamten Meßperiode nur wenige m/z-Werte fokussiert sind. Bei der Aufnahme eines Massenspektrums werden zwar alle m/z-Werte erfaßt, aber jeder m/z-Wert wird nur über einen Zeitraum von einigen Millisekunden gemessen.

3.3.3. Kombinierte Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Bei dem kombinierten GC-MS-System trennt der Gaschromatograph die Probe in seine einzelnen Komponenten auf. In einem zwischengeschalteten Separator wird das leichte Trägergas abgepumpt, die schweren Probenmoleküle gelangen durch Düsen zur Ionenquelle. Dieser Separator muß deshalb zwischengeschaltet werden, da im Massenspektrometer Hochvakuum herrschen muß (Alfredson, 1976).

Abb. 2 Schematische Darstellung des LKB Massenspektrometers GC/MS-2091



3.4. Verhalten der Valproinsäure und ihrer markierten Varianten im Gaschromatographen

Zur quantitativen Messung wurden die Valproinsäure und ihre markierten Varianten als freie Säuren auf eine FFAP-Säule in den Gaschromatographen eingespritzt. Dabei ergab sich das Problem, daß zwar die Valproinsäure, wenn sie allein eingespritzt wurde, nach einer gewissen Aufsättigungszeit reproduzierbare Ergenisse zeigte, wenn jedoch die markierten Varianten hinzugegeben wurden, waren die erscheinenden Peaks in keiner Weise mehr mit den injizierten Mengen der individuellen Säuren korrelierbar. Es erschienen zum Beispiel nach Aufsättigung der Säule mit Valproinsäure und nachfolgender Injektion von D_4-markierter Valproinsäure erst keine Peaks auf dem D_4-Kanal, sondern nur auf dem Valproinsäure-Kanal, was bedeutet, daß die injizierte D_4-markierte Valproinsäure in der Säule verblieb, dafür aber eine quantitativ adäquate Menge Valproinsäure aus der Säule zum Detektor gelangte. Erst nach mehrmaliger Einspritzung erschien markierte Valproinsäure.

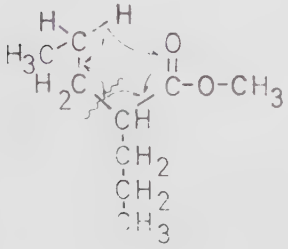
Nach erneuter Einspritzung der unmarkierten Valproinsäure allein, ergab sich wiederum das gleiche Problem, es wurde noch D_4-Valproinsäure aus der Säule eluiert. Offensichtlich existiert aufgrund der Polarität der Säuren und der verwendeten stationären Phase (FFAP) ein Säurepool in der Säule. Eine in den Säurepool eingespritzte Säure mischt sich mit diesem und verdrängt eine äquimolare Menge anderer Säuren. Um die Substanzen unpolarer zu machen, wurden die markierten und die unmarkierte Valproinsäure nach der Extraktion methyliert. Die unpolaren Methylester, welche auf einer OV-17 Säule gemessen wurden, zeigten keine derartigen Effekte und konnten so quantitativ gemessen werden.

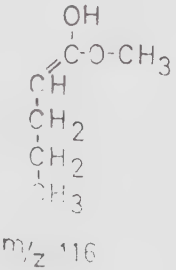
3.5. Massenspektrometrisches Verhalten des Valproinsäuremethylesters und seiner markierten Varianten

Ein Molekülion ist im Massenspektrum nicht vorhanden.

Der Base-Peak des Massenspektrums des Valproinsäuremethylesters hat die Masse m/z = 87. Er entsteht durch allylische Abspaltung einer Äthylgruppe ($CH_3CH_2^{\bullet}$) von dem McLafferty-Umlagerungsprodukt mit der Masse m/z = 116.

Zweithöchster Peak mit 54 % vom Base-Peak ist ein McLafferty Umlagerungsprodukt. Es entsteht auf folgende Weise:



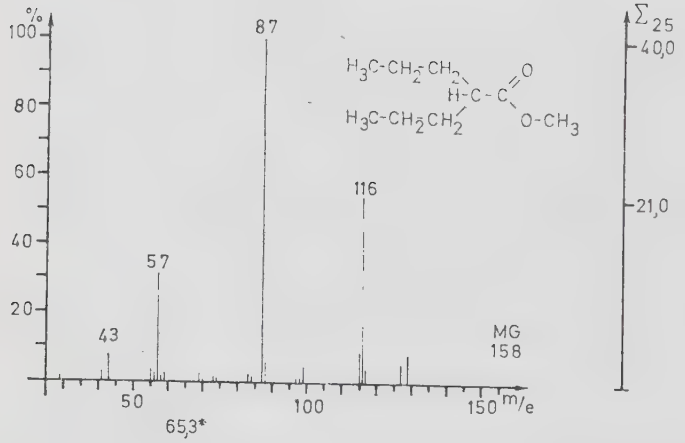


m/z 116

Die Entstehungsmechanismen der Spalt- und Umlagerungsprodukte der D_4- und D_{14}-Valproinsäuremethylester sind analog, es verschieben sich nur die Massen je nach Anzahl der Deuteriumatome. So hat das McLafferty Umlagerungsprodukt des D_{14}markierten Valproinsäuremethylesters die Masse m/z = 124.

Es steht ungefähr im gleichen Verhältnis zum Base-Peak m/z = 9o, wie das entsprechende Ion m/z = 116 des unmarkierten Valproinsäuremethylesters zu m/z = 87. Aus dem D_4-Valproinsäuremethylester entstehen zwei Umlagerungsprodukte (m/z = 118 und m/z = 119), je nachdem ob bei der Bildung ein Protium oder ein Deuterium umgelagert wird.

Abb. 3 Massenspektrum von Valproinsäuremethylester, gemessen bei 2o eV



3.6. Einstellung des LKB 2o91 GC/MS-Systems für die quantitative Messung von Valproinsäure und ihrer markierten Varianten

3.6.1. Gaschromatographie-Bedingungen

Säule: 3 % OV 17 auf Gas-Chrom Q,1oo/12o mesh
Glassäule 2 mm Innendurchmesser, 9o cm Länge

Temperaturen: Injektor: 14o°
Säule: 77° isotherm
Separator: 25o°

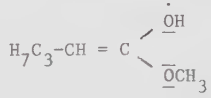
Trägergasfluß: 3o ml He/min

3.6.2. Massenspektrometer-Bedingungen

Gemessen werden die McLafferty-Bruchstücke der Methylester:

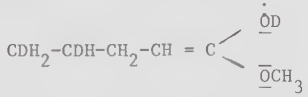
für den unmarkierten Valproinsäuremethylester

m/z = 116 ($C_6H_{12}O_2$)



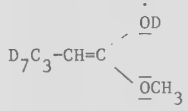
für den D_4-Valproinsäuremethylester

m/z = 119 ($C_6H_9D_3O_2$)



für den D_{14}-Valproinsäuremethylester

m/z = 124 ($C_6H_4D_8O_2$)



Ionisierungsenergie: 2o eV
Kathodenstrom: 5o uA
Ionenquellentemperatur: 25o°
Beschleunigungsspannung: 3,5 kV für m/z = 116
3,4 kV für m/z = 119
3,27 kV für m/z = 124

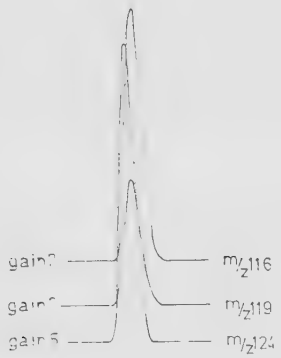
Sekundärelektronenstrom-
vervielfacher: 85o (ca. 3,2 kV)

MID-Einheit:
Peakduration: 16 längst mögliche Meßzeit (1o)
Magnetfeldeinstellung: 116,4 nach Eichung
UV-Schreiber: maximale Empfindlichkeit
Papiervorschub: 2,5 cm/min

Die Retentionszeit der Valproinsäure und ihrer markierten Varianten betrug 1,5 min. Alle drei Minuten erfolgte eine Einspritzung. Jede Probe wurde dreimal injiziert. Es wurde bis zu 1o Std. fortlaufend gemessen, ohne daß eine Änderung der Retentionszeit oder der Peakform auftrat.

Ausgewertet wurden die im UV-Schreiber registrierten Peaks durch Messung der Peakhöhe mit einem Lineal. Da die Messung der einzelnen Massen zumeist auf verschiedenen Empfindlichkeitsstufen erfolgte, wurde vor Berechnung der Ratio auf eine einheitliche Empfindlichkeitsstufe umgerechnet.

Abb. 4 Ionenströme der Massen m/z = 116, m/z = 119, m/z = 124 bei der Analyse eines Plasmas nach Zusatz von 5o µg VPA, 5o µg D_4-VPA, 25 µg D_{14}-VPA



3.7. Berechnung der Valproinsäurekonzentrationen im Plasma

Die Plasmakonzentrationen der Valproinsäure wurde nach folgender Gleichung errechnet:

$$\text{Konz VPA} = \frac{1}{b} \times \frac{H\ 116}{H\ 124}$$

Konz VPA = Konzentration der Valproinsäure in 1 ml Plasma (µg/ml)

b = Steigung der Eichgeraden (s. Erstellung der Eichgeraden)
H 116 = Höhe des Peaks m/z 116 (cm)
H 124 = Höhe des Peaks m/z 124 (= interner Standard) (cm)

3.8. Berechnung der D_4-Valproinsäurekonzentrationen im Plasma

Bei der Berechnung der D_4-Valproinsäurekonzentrationen war ein durch die unmarkierte Valproinsäure hervorgerufener Anteil zu berücksichtigen. Bestimmt wurde dieser Anteil, indem 1o Proben mit verschiedenen Valproinsäurekonzentrationen ohne jegliche D_4-Valproinsäure aufgearbeitet und gemessen wurden. Es wurde jeweils die Höhe des auf m/z 119 erscheinenden Signals zu der Höhe des auf m/z 116 erscheinenden Peaks in Verhältnis gesetzt. Der Mittelwert des auf der D_4-Valproinsäurespur erscheinenden Signals betrug o,11 % von m/z 116.

Die D_4-Valproinsäurekonzentration wurde dann nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Konz } D_4\text{VPA} = \frac{1}{b} \times \frac{H\ 119 - (0{,}0011 \times H\ 116)}{H\ 124}$$

3.9. Erstellung der Eichkurve der D_4-Valproinsäure

Zur Ermittlung der Eichkurve der D_4-Valproinsäure wurden verschiedene Mengen D_4-Valproinsäure und konstante Mengen Valproinsäure und D_{14}-Valproinsäure in 1 ml Leerplasma einpipettiert. Die sich daraus ergebenden Endkonzentrationen lagen bei der Valproinsäure zwischen o,1 µg - 5o µg/ml, welches den erwarteten Plasmakonzentrationen entsprach. Die Konzentration der Valproinsäure betrug in allen Proben 5o µg, die der D_{14}-Valproinsäure (interner Standard) 25 µg. Zur Sicherung der Meßergebnisse wurden jeweils Doppelproben aufgearbeitet und jeder Plasmaextrakt 3 mal in das GC-MS-System injiziert. Die Eichkurve wurde aus den Mittelwerten erstellt. Die Höhe des Peaks m/z 119 wurde, wie oben angegeben, korrigiert.

Tabelle 1

Valproinsäurekonzentration: je 5o µg/ml Plasma

D_{14}-Valproinsäurekonzentration: je 25 µg/ml Plasma

D_4-Valproinsäurekonzentration µg/ml	Ratio m/z 119 m/z/124
o,1	o,oo21
o,25	o,oo49
o,5	o,o1o3
1,o	o,o2o8
5,o	o,1o51
1o,o	o,2o73
25,o	o,5322
5o,o	1,o35o

Die Regression wurde mit einem Taschenrechner vom Texas-Instruments, Typ Ti-51-III, errechnet.

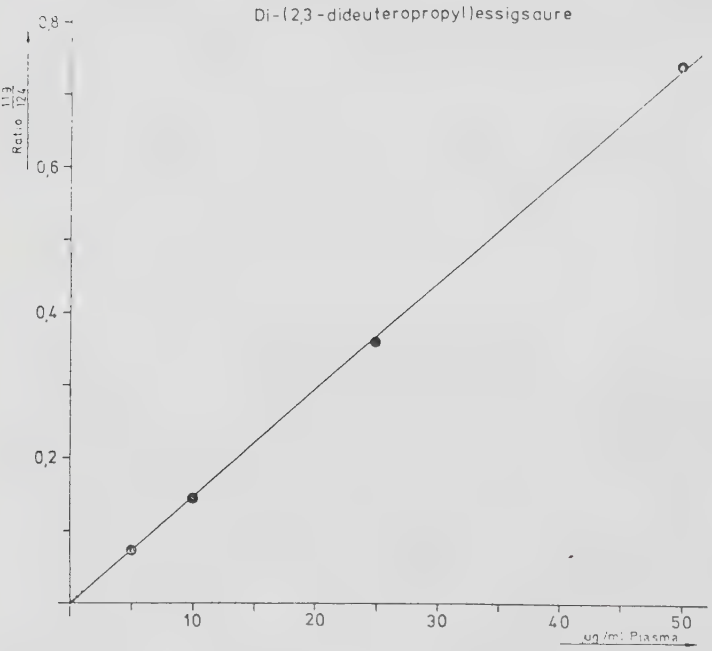
Die Gerade ging durch den Nullpunkt, der Regressionskoeffizient betrug o,999.

Die Steigerung (b) der Geraden wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$y = \frac{x\ y}{x^2} \cdot x = b \cdot x$$

Die Steigerung betrug o,o2o8

Abb. 5 Eichkurve für D_4-Valproinsäure. Die Meßpunkte wurden durch Auftragen der Peakhöhenverhältnisse von D_4-VPA zu D_{14}-VPA, interner Standard, (Ordinate) gegen die eingesetzte Konzentration (Abzisse) erhalten.



3.1o. Eichkurve der Valproinsäure

Die Eichkurve der Valproinsäure wurde nach dem gleichen Prinzip erstellt, nur wurden hier verschiedene Mengen der unmarkierten Valproinsäure (im Bereich von 25 - 1oo µg) einpipettiert und die Konzentrationen der D_4- Valproinsäure und der D_{14}-Valproinsäure (beide je 25 µg) konstant gehalten.

Tabelle 2

D_4-Valproinsäurekonzentration: je 25 µg/ml Plasma
D_{14}-Valproinsäurekonzentration: je 25 µg/ml Plasma

Valproinsäurekonzentration (µg/ml)	Ratio m/z 116 / m/z 124
25	1,17
5o	2,24
75	3,54
1oo	4,57

Die Gerade ging ebenfalls durch den Nullpunkt, der Regressionskoeffizient betrug o,999.

Die Steigung b betrug o,o461.

3.11. Prüfung der Richtigkeit

Zur Prüfung der Richtigkeit wurden in jeweils 1o Plasmaproben bekannte Mengen (Tabelle 3/4) Valproinsäure, D_4-Valproinsäure, D_{14}-Valproinsäure einpipettiert, aufgearbeitet und gemessen. Nach erfolgter Analyse wurden eingesetzte und ermittelte Werte miteinander verglichen.

Tabelle 3

Für 1o separat aufgearbeitete Plasmaproben mit dem theoretischen Gehalt von 5o µg Valproinsäure, 25 µg D_4-Valproinsäure und 25 µg D_{14}-Valproinsäure wurden folgende Mittelwerte nach jeweils 3 Einspritzungen gefunden:

µg VPA/ml Plasma	µg D_4-VPA/ml Plasma
5o,28	25,48
49,86	25,35
5o,3o	25,51
49,94	25,75

µg VPA/ml Plasma	µg D_4-VPA/ml Plasma
5o,43	25,o8
49,84	25,58
49,49	25,66
49,79	25,57
5o.92	25,51
5o,89	25,37
∑ 5o1,74	254,89

Mittelwert	
5o,17	25,49
Standardabweichung	
o,48	o,19
Variationskoeffizient	
o,95 %	o,74 %

Tabelle 4

Für 1o separat aufgearbeitete Plasmaproben mit dem theoretischen Gehalt von 5o µg Valproinsäure, o,5 µg D_4-Valproinsäure, 25 µg D_{14}-Valproinsäure wurden folgende Mittelwerte nach jeweils 3 Einspritzungen gefunden:

µg VPA/ml Plasma	µg D_4-VPA/ml Plasma
48,76	o,5o
49,19	o,48
5o,o4	o,51
49,82	o,5o
5o,23	o,5o
49,82	o,49
49,22	o,48
49,4o	o,48
5o,1o	o,48
5o,12	o,49
∑ 496,7	4,91

Mittelwert	
49,67	o,49
Standardabweichung	
o,5	o,o1
Variationskoeffizient	
1,o %	2,3 %

4. Probandenversuch zum Ausschluß eines Isotopeneffektes

Zum Ausschluß eines Isotopeneffektes der markierten Valproinsäure wurden einer gesunden Probandin gleichzeitig gleiche Mengen an Valproinsäure und D_4-Valproinsäure gegeben. Beides wurde in Form des Na-Salzes gegeben und in 1oo ml Wasser gelöst. Die Menge (3oo mg Na-Valproinat und 31o mg Na-D_4-Valproinat) entsprach dem Wirkstoffinhalt von zwei handelsüblichen Tabletten. Nach der Applikation wurden Blutproben entnommen, nach dem oben genannten Extraktionsverfahren aufgearbeitet und gemessen.

Der Vergleich der Plamaspiegelverläufe ergab, daß im Rahmen der Meßgenauigkeit diese Tetradeuteroform keinen Isotopieeffekt aufweist.

Tabelle 5

Plasmaspiegelverlauf bei simultaner Gabe von 3oo mg Na-Valproinat und 31o mg Na-D_4-Valproinat.

Zeit (h)	VPA (µg/ml)	D_4-VPA (µg/ml)
o	o	o
o,5	34,5	36,7
1	34,2	36,7
2	3o,3	32,9
3	29,2	31,6
4	28,9	3o,8
6	23,7	27,6
1o	19,6	22,2
24	8,5	9,5
3o	6,5	7,3
47	3,1	3,5
48	2,9	3,3
71	1,2	1,3
72	1,2	1,3

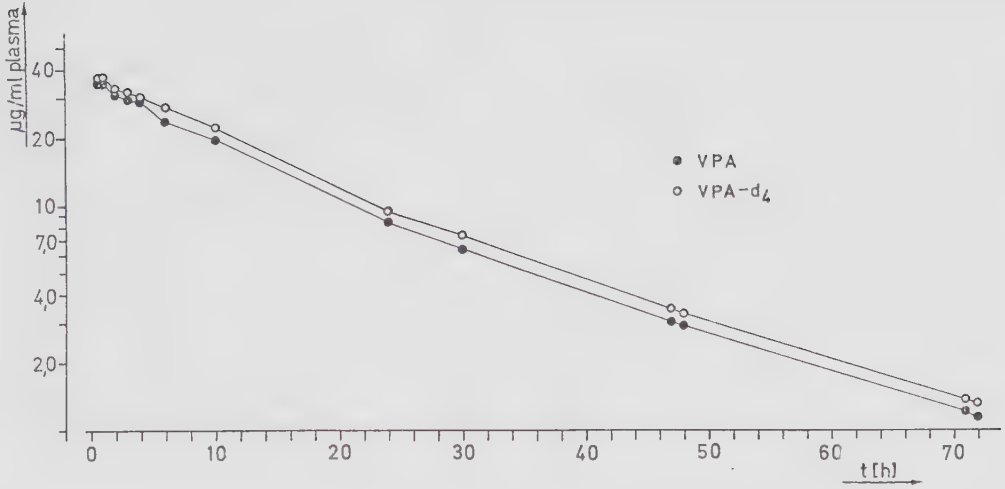


Abb. 6 Halblogarithmische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Valproinsäurekonzentration und der D_4-Valproinsäurekonzentration im Plasma einer gesunden Probandin nach einmaliger Gabe von 3oo mg Na-Valproinat und 3lo mg Na-D_4-Valproinat.

5. Valproinsäuredisposition bei Patienten mit epileptischem Anfallsleiden

5.1. Auswahl der Patienten

Die Kinetik der Valproinsäure wurde bei 15 Patienten mit epileptischem Anfallsleiden gemessen. Alle Patienten wurden in der neurologischen Universitätsklinik Bonn-Venusberg, Abteilung für Epileptologie, behandelt und für die Zeit der Studie stationär aufgenommen.

Die Auswahl der Patienten erfolgte nach folgenden Kriterien:

1. Es wurden nur Patienten mit einem chronischen epileptischen Anfallsleiden, unabhängig von der Genese, ausgewählt.

2. Die Patienten sollten außer ihres epileptischen Anfallsleidens keine weiteren Erkrankungen, insbesondere Leber- oder Nierenerkrankungen, haben. Dies wurde durch eine gezielte Laboratoriumsdiagnostik gesichert.

3. Bevorzugt ausgewählt wurden Patienten, die neben der Valproinsäuretherapie noch ein oder mehrere Antiepileptika erhielten, wie zum Beispiel Phenobarbital, Primidon, Carbamazepin, Clonazepam oder Diphenylhydantoin. Um ein Vergleichskollektiv zu erhalten, wurden aber auch Patienten, die eine Monotherapie erhielten, mit in die Studie einbezogen.

4. Die Patienten sollten ihre Therapie schon über einen genügend langen Zeitraum (mindestens 4 Wochen) unverändert erhalten haben.

5. Es sollten Patienten beiderlei Geschlechtes an der Studie teilnehmen.

Voraussetzung zur Teilnahme an der Studie war eine schriftliche Einverständniserklärung der Patienten, nach vorausgegangener ausführlicher Aufklärung über Sinn und Verlauf der Studie.

Tabelle 6 Patienten

Patient	Art des epileptischen Anfallsleidens	unveränderte Therapie seit
M.J.	genuine Epilepsie mit komplexen Absencen	12 Monaten
K.D.	Grand-mal-Anfälle mit Absencen	2 Monaten
K.E.	Grand-mal-Anfälle mit Petit-mal-Anfällen	2 Monaten
S.B.	nicht klassifizierbare Anfälle	5 Monaten
H.M.	genuine Epilepsie mit Grand-mal-Anfällen, komplexen Absencen, psychomotorischen Anfällen und Sturzanfällen	2 Monaten
B.M.	Epilepsie unsicherer ätiologischer Zuordnung mit adversiv beginnenden Grand-mal-Anfällen und Absencen	24 Monate
W.F.	Epilepsie mit Grand-mal-Anfällen und Absencen	15 Monaten
K.A.	Symptomatische Epilepsie am ehesten auf dem Boden einer frühkindlichen Hirnschädigung mit isolierten Auren und fokal beginnenden und betonten, nur selten zu typischen Grand-mal-Anfällen generalisierenden Anfällen	6 Wochen
S.B.	symptomatische Epilepsie mit psychomotorischen und Grand-mal-Anfällen ungeklärter Ätiologie	5 Monaten

Patient	Art des epileptischen Anfallsleidens	unveränderte Therapie seit
P.D.	Epilepsie mit pyknoleptischen Anfällen	12 Monaten
J.H.	Grand-mal-Anfälle mit Absencen	12 Monate
B.W.	Epilepsie mit komplexen Absencen und seltenen Grand-mal-Anfällen	24 Monaten
K.G.	genuine Epilepsie mit Grand-mal-Anfällen und Absencen	19 Monaten
G.U.	Epilepsie unsicherer ätiologischer Zuordnung mit Grand-mal-Anfällen	36 Monaten
N.H.	Epilepsie mit psychomotorischen Anfällen und sekundären Grand-mal-Anfällen	6 Wochen

Tabelle 7 Patientendaten

Patient	Geschlecht	Alter (J)	Gewicht (kg)	Laborwerte GOT (U/l)	GPT (U/l)	GT (U/l)	Kreatinin (mg %)
M.J.	m	23	61	1o	9	-	o,67
K.D.	w	19	85	8	12	9	o,57
K.E.	w	19	85	7	9	4	o,57
S.B.	w	39	61	5	4	12	o,59
H.M.	w	44	58	9	12	25	o,67
B.M.	m	32	81	6	13	34	o,71
W.F.	m	49	76	7	13	7o	o,75
K.A.	w	25	52	8	14	49	o,71
S.B.	w	39	73	5	6	13	o,56
P.D.	w	33	58	8	11	19	o,5
J.H.	m	22	84	9	16	28	o,83
B.W.	m	23	84	8	22	-	o,83
K.G.	w	26	55	8	9	21	o,71
G.U.	w	21	57	12	21	29	o,69
N.H.	m	21	61	7	8	37	o,67

Tabelle 8 Therapiekombinationen

Pat.	Valproinsäure[1] Na-Valproinat[2]	Phenobarbital[1] Barbexaclon[2]	Carbamazepin	Primidon	Clonazepam	Ethosuximid	Diphenyl-hydantoin
M.J.	1200 mg[2]	-	-	-	-	-	-
K.D.	1200 mg[2]	-	-	-	-	-	-
K.E.	1200 mg[2]	-	-	-	-	-	-
S.B.	1800 mg[2]	-	-	-	-	-	-
H.M.	2400 mg[2]	200 mg[1]	-	-	-	-	-
B.M.	2100 mg[2]	300 mg[2]	-	-	-	-	-
W.F.	2400 mg[1]	100 mg[2]	-	-	-	500 mg	350 mg
K.A.	1800 mg[2]	150 mg[2]	1200 mg	-	-	-	-
S.B.	1500 mg[2]	-	1000 mg	-	-	-	-
P.D.	3000 mg[2]	-	600 mg	-	-	-	-
J.H.	2400 mg[2]	-	600 mg	-	-	-	-
B.W.	3600 mg[1]	-	800 mg	-	1,5 mg	-	-
K.G.	2400 mg[2]	-	800 mg	-	1,5 mg	-	-
G.U.	1800 mg[2]	-	-	500 mg	-	-	-
N.H.	1500 mg[2]	-	-	750 mg	-	-	-

5.2. Versuchsbeschreibung

Abhängig von der Höhe der morgendlichen Dosis wurde die gesamte oder ein Teil der zu verabreichenden Menge an Valproinsäure durch eine wässerige Lösung von Na-D_4-Valproinat und Na-Valproinat ersetzt und zwar nach folgendem Schema:

morgendliche Dosis	Gabe von
3oo mg Na-VPA Tabl.	3o7 mg Na-D_4-VPA Lösung
6oo mg Na-VPA Tabl.	3o7 mg Na-D_4-VPA Lösung 3oo mg Na-VPA Lösung
9oo mg Na-VPA Tabl.	3o7 mg Na-VPA Lösung 3oo mg Na-VPA Lösung 3oo mg Na-VPA Tabl.

Die Lösung wurde durch Einwaage der freien Säuren (26o mg VPA bzw. 267 mg D_4-VPA) hergestellt, die mit NaOH neutralisiert und dann in 1oo ml Wasser gelöst wurden.

Verschiedentlich wurde in der Therapie nicht die Tablettenform, welche das Na-Salz der Valproinsäure enthält verwandt, sondern eine Kapsel, welche 3oo mg freie Säure enthält. In diesem Falle wurden nicht 26o mg freie Säure sondern 3oo mg VPA bzw. 3o7 mg D_4-VPA eingewogen und neutralisiert.

Die Einnahme der morgendlichen Dosis erfolgte auf nüchternen Magen. Die sonstigen Tabletteneinnahmen, wie auch die folgenden Valproinsäure-Tabletteneinnahmen, erfolgten wie gewohnt. Das Frühstück wurde eine Stunde nach Applikation der Lösung eingenommen.

Vor Einnahme und 1/4, 1/2, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 14, 24, 35, 36, 48, 49 und 72 Std. nach Applikation der markierten Valproinsäure wurden Blutproben entnommen. Die Entnahme erfolgte über eine Verweilkanüle, die vor Versuchsbeginn gelegt und solange als möglich benutzt wurde. Die folgenden Blutentnahmen erfolgten durch erneute Venenpunktion. Zwischen den Blutentnahmen wurde die Verweilkanüle mit physiologischer Kochsalzlösung, die auf 1oo ml 5ooo IE Heparin enthielt, gespült.

Tabelle 9 Mittelwerte der D_4-Valproinsäurekonzentrationen im Plasma (µg/ml)

Pat.	0	1/4	1/2	1	2	4	6	8	12	14	24	35	36	48	49	72
M.J.	--	2o,3	36,5	33,4	32,1	26,9	22,2	18,3	14,4	13,3	6,3	-	2,5	1,o	-	--
K.D.	--	23,7	28,8	29,8	27,4	23,6	-	19,6	14,9	11,o	6,9	3,1	2,9	1,3	1,1	o,22
K.E.	--	-	26,5	25,6	26,5	19,9	-	17,6	14,6	12,7	7,o	2,4	1,6	-	o,54	o,22
S.B.	--	22,o	32,4	29,3	-	28,9	-	19,8	-	13,2	7,2	-	3,28	1,2	-	o,17
H.M.	--	27,4	33,5	3o,9	23,8	$15,5^5$	13,2	8,8	5,8	2,8	o,86	-	o,21	--	--	--
B.M.	--	2o,4	19,2	18,9	16,o	14,o	11,1	8,9	5,9	4,5	1,3	o,39	o,31	--	--	--
W.F.	--	3o,9	29,6	23,7	19,9	13,6	8,2	6,4	3,3	2,2	o,46	--	--	--	--	--
K.A.	--	14,5	22,6	32,4	35,8	31,8	26,8	$16,1^9$	11,6	8,8	3,1	-	o,83	o,35	-	--
S.B.	--	18,8	23,5	31,2	28,9	23,2	21,3	16,3	11,2	8,7	4,4	1,4	1,3	o,49	o,44	--
P.D.	--	19,7	26,o	37,3	31,1	27,6	25,1	21,7	15,3	13,8	3,3	1,2	o,97	o,18	-	--
J.H.	--	15,9	21,6	2o,2	18,3	13,o	1o,8	8,4	5,5	4,8	1,2	o,29	o,26	--	--	--
B.W.	--	18,6	24,7	23,o	18,4	14,4	9,2	6,9	3,8	2,5	o,51	--	--	--	--	--
K.G.	--	21,7	36,2	32,9	28,6	23,2	15,9	12,8	9,3	5,5	2,5	o,64	o,53	o,14	o,12	--
G.U.	--	25,8	26,7	28,8	$29,8^3$	-	2o,5	16,3	12,4	11,o	3,1	-	o,76	o,16	-	--
N.H.	--	22,1	29,3	27,6	25,5	21,6	16,2	15,2	9,8	8,9	2,9	o,9o	o,81	o,21	o,19	--

-- = gemessen, aber kein D_4-VPA nachweisbar

- = nicht abgenommene Werte

xx^x = Änderung der Abnahmezeit (hochgestellte Ziffer bedeutet abweichende Abnahmezeit)

Tabelle 1o Mittelwerte der Valproinsäurekonzentrationen im Plasma (µg/ml)

Pat.	0	1/4	1/2	1	2	4	6	8	12	14	24	35	36	48	49	72
M.J.	52,o	62,4	8o,3	73,2	71,8	6o,1	5o,1	44,4	32,2	31,1	49,8	-	65,1	53,6	-	63,1
K.D.	61,6	65,8	76,6	8o,3	74,3	65,1	-	53,6	4o,8	7o,2	5o,9	53,1	48,4	57,9	8o,4	54,5
K.E.	54,4	-	76,6	71,2	78,1	56,7	-	52,2	45,9	59,1	5o,o	36,3	57,3	-	6o,4	51,3
S.B.	1o4,5	1o5,7	1o7,4	98,4	-	1oo,2	-	65,8	-	94,5	8o,o	-	74,7	77,8	-	89,6
H.M.	34,6	49,2	49,3	49,3	1o1,7	58,1[5]	52,7	81,6	59.9	96,1	88,1	-	61,o	9o,4	-	43,3
B.M.	56,6	63,3	61,o	55,5	46,8	4o,7	32,5	45,3	33,3	22,4	37,3	37,1	4o,9	28,7	35,8	44,1
W.F.	2o,4	4o,4	4o,9	33,3	29,3	57,7	39,7	31,1	4o,4	55,9	21,7	36,5	4o,4	49,7	44,4	26,2
K.A.	26,o	23,2	2o,4	21,4	19,6	17,6	15,2	4o,1[9]	58,3	44,2	24,1	-	37,9	49,o	-	31,o
S.B.	37,4	48,8	49,2	51,9	49,7	4o,1	37,4	74,7	54,2	41,5	4o,7	85,8	77,5	45,9	45,2	4o,6
P.D.	64,6	74,8	74,9	89,5	79,8	71,9	64,9	55,2	41,o	37,8	87,7	67,8	82,7	85,5	-	1o3,3
J.H.	37,9	47,7	49,6	47,7	45,6	49,4	4o,3	33,9	36,3	29,9	4o,1	78,o	65,2	25,2	21,6	65,7
B.W.	43,o	5o,7	55,1	78,9	62,3	49,5	82,1	68,9	81,1	94,6	38,4	79,7	77,9	43,9	4o,9	43,9
K.G.	49,8	63,3	72,5	69,9	61,8	51,6	92,7	71,2	6o,9	78,4	52,1	73,1	63,9	55,5	59,9	52,7
G.U.	65,8	72,o	7o,1	77,8	61,4[3]	-	46,4	37,6	28,5	31,2	53,8	-	6o,2	56,5	-	52,9
N.H.	44,8	49,9	51,3	46,3	44,1	36,2	28,8	26,9	17,4	15,9	43,8	52,9	46,6	44,7	43,8	45,9

\- = nicht abgenommene Werte

xx[x] = Änderung der Abnahmezeit (hochgestellte Ziffer bedeutet abweichende Abnahmezeit)

6. Pharmakokinetik der Valproinsäure

Für die Berechnung der Valproinsäurekinetik wurde ein Ein-Kompartiment-Modell zugrunde gelegt. Bei einem Ein-Kompartiment-Modell wird der Körper als ein einheitlicher Verteilungsraum angesehen.

Die in einem Verteilungsraum bzw. Kompartiment vorliegende Konzentration K hängt bei intravenöser Applikation eines Arzneimittels von der Dosis und der Größe des Verteilungsraumes ab. Die Konzentration eines Arzneimittels ist zeitabhängig und hängt von Invasion und Elimination ab. Die Geschwindigkeit des Konzentrationsabfalles hängt bei i.v.-Applikation nur von der Eliminationskonstanten ab.

Bei oraler Applikation eines Arzneimittels finden Absorptionen und Elimination gleichzeitig statt, das heißt, der Eliminationsvorgang ist zu Beginn nicht nur von der Eliminationskonstanten abhängig, sondern auch von der Absorptionskonstanten. Bei den Experimenten mit der D_4-Valporinsäurelösung erfolgte die Absorption sehr rasch (t_{max} = 1/4 - 1 Std.) und ist nach ca. 2 - 4 Std. beendet.

Dargestellt werden kann die resultierende Plasmakonzentration bei gleichzeitiger Invasion und Evasion durch die Bateman-Gleichung:

$$K_p = \frac{C_o \cdot k_a \cdot (e^{-k_{el} \cdot t} - e^{-k_a \cdot t})}{k_a - k_{el}}$$

K_p = Plasmakonzentration

C_o = Konzentration zum Zeitpunkt 0

k_a = Absorptionskonstante

k_{el} = Eliminationskonstante

6.1. Berechnung des Verteilungsvolumens (V_d)

Das Verteilungsvolumen ist ein Proportionalitätsfaktor, der die Konzentration eines Arzneimittels im Plasma zur Menge des im Körper vorhandenen Arzneimittels in Beziehung setzt.

Errechnet wird das Verteilungsvolumen nach folgender Gleichung:

$$V_d = \frac{\text{Dosis p.o.}}{C_o \cdot \text{Körpergewicht}}$$

Der fiktive Initialblutspiegel C_o ließ sich durch Extrapolieren der Geraden zurück zur Y-Achse ermitteln.

6.2. Berechnung der Plasmaclearance (Cl_p)

Die Clearance ist ein Maß zur Charakterisierung der Elimination. Sie wird berechnet nach folgender Gleichung:

$$Cl_p = \frac{F \cdot \text{Dosis p.o.}}{AUC}$$

F = Anteil des Arneimittels, welcher resorbiert wird
im Fall der D_4-VPA-Lösung ca 100 %

AUC = Fläche unter der Kurve der gemessenen Plasmaspiegelwerte, die nach der Trapezsummenformel berechnet wurde.

$$AUC = \sum_{t_o}^{t_\infty} \frac{y_{n-1} + y_n}{2} (t_n - t_{n-1})$$

6.3. Berechnung der Plasmahalbwertszeit

Die Plasmahalbwertszeit (t1/2) wurde durch eine semilogarithmische Regressionsanalyse über die Methode kleinster Fehlerquadrate der Plamakonzentrationen gegen die Zeit ermittelt (Mikrocomputersystem Olivetti P 652).

Berechnet wurde die Plasmahalbwertszeit von dem Zeitpunkt, an dem die semilogarithmische Kurve eine Gerade wurde (normalerweise nach 4 - 6 Std.).

7. Ergebnisse

Tabelle 11 Pharmakokinetische Daten von D_4-VPA im Plasma von Patienten mit epileptischem Anfallsleiden nach oraler Einnahme einer Einzeldosis und fortgesetzter VPA-Therapie

1. Patienten mit Valproinsäure-Monotherapie

Patient	t 1/2	AUC	C_o	V_d (l/kg)	Cl_p (ml/min)
M.J.	9,2	53o,8	36,9	o,14	9,6
K.D.	1o,7	541,5	32,o	o,11	9,4
K.E.	9,4	492,8	32,4	o,11	1o,4
S.B.	9,4	576,9	36,9	o,17	8,9
$\bar{x}$	9,7			o,13	9,6
$\pm$	$\pm$ o,7			$\pm$ o,o3	$\pm$ o,6

2. Patienten mit Kombinationstherapie

Patient	t 1/2	AUC	C_o	V_d(l/kg)	Cl_p(ml/min)
H.M.	4,7	253,4	3o,1	o,17	21,7
B.M.	5,8	2o3,5	23,3	o,16	25,1
W.F.	3,6	177,7	29,2	o,13	28,8
K.A.	6,5	445,3	41,3	o,14	11,5
S.B.	7,6	383,o	35,o	o,12	13,4
P.D.	5,8	469,9	54,1	o,1	1o,8
J.H.	5,5	181,3	23,4	o,15	28,2
B.W.	4,2	218,5	26,2	o,16	26,9
K.G.	6,1	338,o	39,o	o,14	15,1
G.U.	6,2	4o5,2	39,5	o,15	12,6
N.H.	6,7	357,7	32,1	o,15	14,3
$\bar{x}$	5,7			o,14	18,9
$\pm$	$\pm$ 1,2			$\pm$ o,o2	$\pm$ 7,2

Der Vergleich beider Gruppen zeigt, daß die Plasmahalbwertszeiten bei Patienten, die eine Kombinationstherapie von Valproinsäure und anderen Antikonvulsiva wie Phenobarbital, Carbamazepin, Primidon, Clonazepan, Ethosuximid und Diphenylhydantoin erhalten, erheblich kürzer ($5,7 \pm 1,2$) ist, als bei Patienten, welche eine Monotherapie ($9,7 \pm 0,7$) erhalten. Diese Daten stimmen überein mit den Studien von Bowdle, Perrucca und Richens.

Die Plasmaclearance zeigt bei Patienten mit einer Kombinationstherapie einen Anstieg auf ca. das Doppelte ($18,9 \pm 7,2$) gegenüber den Monotherapien ($9,6 \pm 0,6$).

Das Verteilungsvolumen ist in beiden Gruppen gleich und lag in allen von uns gemessenen Patienten in einem sehr engen Bereich (0,1 - 0,17 im Gegensatz zu Literaturwerten, welche Werte zwischen 0,1 - 0,4 angeben), was wir auf unsere genauere Meßmethode zurückführen.

Eine Änderung der Plamahalbwertszeit, bedingt durch eine Änderung des Verteilungsraumes, konnte somit ausgeschlossen werden.

Als Ursache für die Veränderung der Kinetik der Valproinsäure ist eine durch Comedikation bedingte Enzyminduktion anzunehmen.

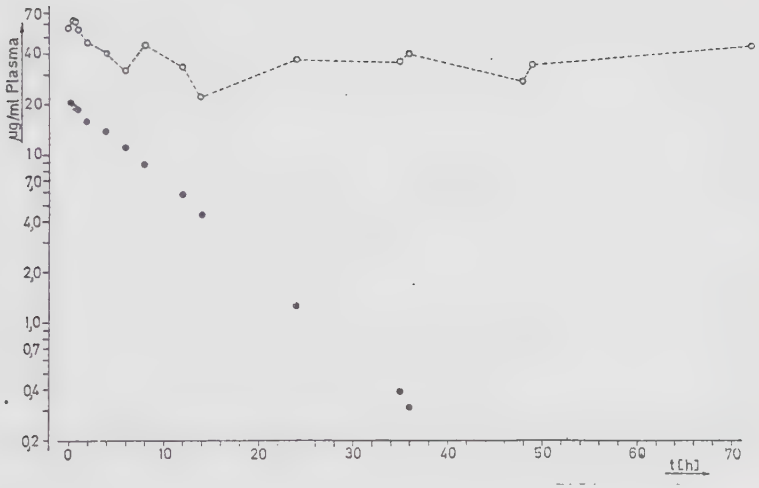


Abb. 7 Halblogarthmische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der D_4-Valproinsäure unter Fortführung der Valproinsäure-Dauertherapie bei einer Patientin mit einer Kombinationstherapie (H.M.). o-o = VPA •• = D_4-VPA

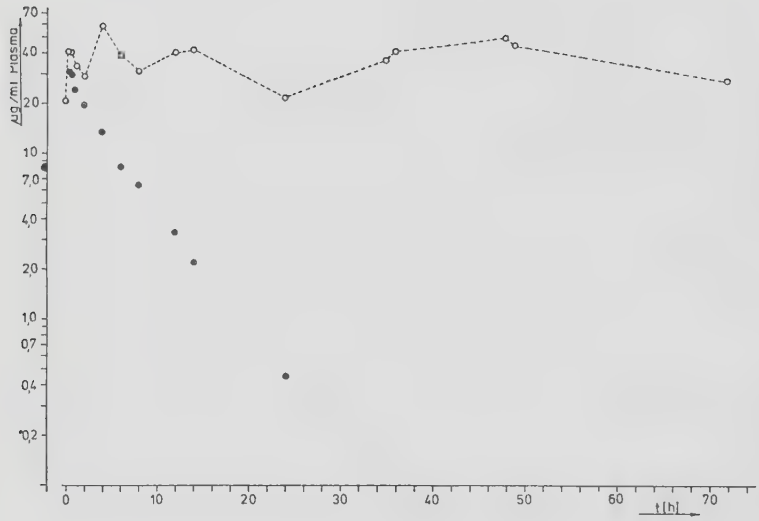


Abb. 8 Halblogarithmische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der D_4-Valproinsäure unter Fortführung der Valproinsäure-Dauertherapie bei einem Patienten mit einer Kombinationstherapie (W.F.) o-o = VPA •• = D_4-VPA

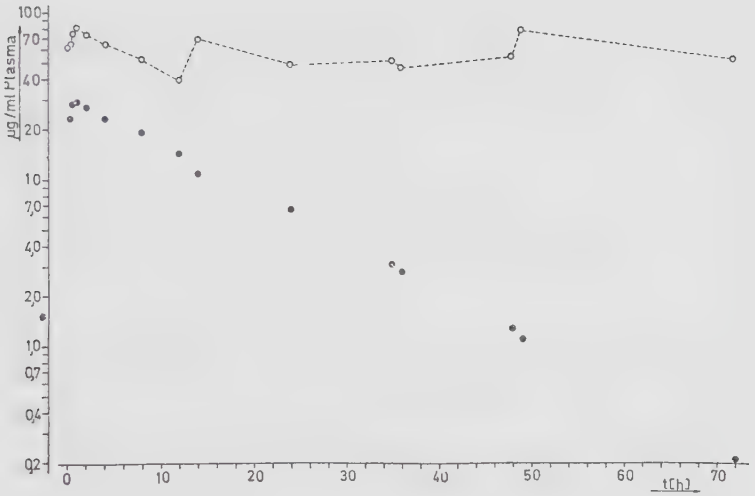


Abb. 9 Halblogarithmische Darstellung des zeitlichen Verlauf der D_4-Valproinsäure unter Fortführung der Valproinsäure-Dauertherapie bei einer Patientin mit einer Monotherapie (S.B.)

o---o = VPA • • = D_4-VPA

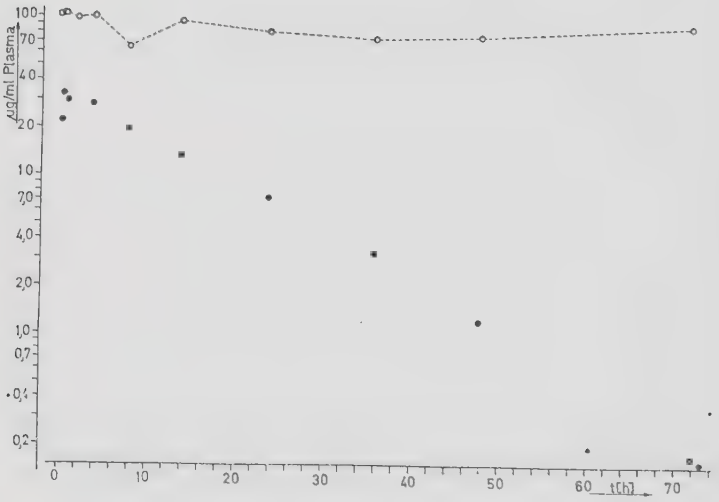


Abb. 1o Halblogarithmische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der D_4-Valproinsäure unter Fortführung der Valproinsäure-Dauertherapie bei einer Patientin mit einer Monotherapie (K.D.)

o---o = VPA • • = D_4-VPA

8. Zusammenfassung

Untersuchungen der Pharmakokinetik der Valproinsäure unter Steady-State-Bedingungen lagen bisher nicht vor.

Deshalb wurde ein chemisch-analytisches Verfahren entwickelt, um die Kinetik der Valproinsäure, ohne Unterbrechung der Therapie, zu messen. Die Messung erfolgte an Patienten, die seit längerer Zeit Valproinsäure entweder als Monotherapie oder in Kombination mit anderen Antiepileptika erhielten. Die von uns durchgeführten Untersuchungen wurden mit Hilfe einer D_4-markierten Valproinsäure, welche einmalig an Stelle einer regulären Tablette gegeben wurde, durchgeführt.

Ein Isotopeneffekt der markierten Valproinsäure konnte durch einen Probandenversuch nach oraler Gabe einer Einzeldosis von 3oo mg Na-VPA und 31o mg Na-D_4-VPA ausgeschlossen werden.

Die Plasmakonzentrationen der VPA, der D_4-VPA und der D_{14}-VPA als internem Standard, wurden durch Messung der McLafferty Bruchstücke der Methylester in einem GC-MS-System mit Elektronenstoßionisation quantitativ bestimmt.

Wir verglichen die pharmakokinetischen Parameter der Gruppe mit Monotherapie mit der Gruppe, welche eine Kombination von Valproinsäure mit anderen Antiepileptika erhielt. Es zeigte sich eindeutig, daß die Plasmahalbwertszeiten und die Plasmaclearens bei Patienten, welche eine Kombinationstherapie erhielten, erheblich kürzer bzw. höher waren, als bei denjenigen Patienten, welche eine Monotherapie erhielten. Da das Verteilungsvolumen in beiden Gruppen gleich war, konnte ausgeschlossen werden, daß diese Unterschiede in der Kinetik durch Änderung des Verteilungsraumes bedingt waren.

Tabelle 12

	$t_{1/2}$ (h)	V_d (l/kg)	Cl_p (ml/min)
Patienten mit Monotherapie	$9,7 \pm o,7$	$o,13 \pm o,o3$	$9,6 \pm o,6$
Patienten mit Kombinationstherapie	$5,7 \pm 1,2$	$o,14 \pm o,o2$	$18,9 \pm 7,2$

Bekanntlich sind Phenobarbital und Carbamazepin potente Enzyminduktoren. In allen Kombinationen, bis auf zwei, kam entweder das eine, das andere, oder beide zusammen zur Anwendung. Zu diskutieren wäre somit eine Enzyminduktion dieser Substanzen, die die Änderung der Kinetik der Valproinsäure zur Folge hätte.

Um genauere Aussagen über den Einfluß jedes einzelnen, nicht nur Phenobarbital und Carbamazepin, dieser zur Comedikation der Valproinsäure verwendeten Substanzen machen zu können, sollen von jeder Kombination mit Valproinsäure größere Vergleichskollektive, auch in unterschiedlichen Dosierungen, gemessen werden.

Unsere Arbeit bewies, daß eine Änderung im Metabolismus der Valproinsäure stattfindet. Dadurch ändert sich die Kinetik der Valproinsäure, mit dem Ergebnis, daß die Plasmaspiegel gegenüber denen in der Literatur angegebenen Werten aus Einzeldosismessungen, erniedrigt vorgefunden werden. Da die Reduktion der Anfallszahl positiv mit der Höhe des Plamaspiegels korreliert, sollte die Änderung des Plasmaspiegels in der Therapie berücksichtigt werden.

9. Literaturverzeichnis

Alfredson, G., Fri CG.:
The mass-fragmentographic technique in the field of psychotic research
Science Tools, The LKB Instument Journal 23, 6 - 9, 1976

Anlezark, G., Horton RW., Meldrum BS., Sawaya MC.:
Anticonvulsant action of ethanolamine-o-sulphate and di-n-propylacetate and the metabolism of gamma-aminobutyric acid (GABA) in mice with audiogenic seizures.
Biochem Pharmcol 25,413-417, 1976

Bergamini, L., Mutani R., Furlan P.M., Riccio A.:
Le Dekapine dans le traitement de l´épilepsie essentielle ou idiopathique.
Schweiz Arch Neurol Neurochir Psychiat 1o6, 1-7, 197o

Bonnin, J.:
Primièrs essais cliniques sur l´action antiépileptique du sel de sodium de l´acide n-dipropylacetique.
Univ Grenoble (Imprimerie Eymond) 1oo S., 1964

Bowdle, TA., Levy R.H., Cutler R. E.:
Effect of carbamazepine on Valproic acid clearance in normal man.
Clinical Pharmacol Ther 25, 215, 1979

Burton, BS.:
On the propyl derivatives and decomposition products of ethylacetate.
Am Chem J 3, 385-395, 1882

Carraz, G., Fau R., Chateau R., Bonnin J.:
Communication a propos des premiers essais cliniques sur l´activité antiépileptique de l´acide n-dipropylacetique (sel de Na).
Ann Med Psychol 122, 577-585, 1964

Ferrandes, Eymard P.:
Méthode rapide d´analyse quantitative du dipropylacetate de sodium dans le sérum ou le plasma.
Ann pharm franc 31, 379-382, 1973

Förster, Ch.:
Antikonvulsive Behandlung mit Dipropylessigsäure im Kindesalter.
Münch med Wschr 114, 399-401, 1972

Fröscher, W., Gehlen W.:
Medikamentöse Therapie der Epilepsien. Indikation, Dosierung und Nebenwirkung der wesentlichen Antiepileptika.
Arznei-Telegramm 6, 41, 1976

Fröscher, W., Schulz HU., Gugler R.:
Valproinsäure in der Behandlung der Epilepsien unter besonderer Berücksichtigung des Serumspiegels, Fortschr Neurol Psychiat 46, 327-341, 1978

Godin, Y., Heiner, L., Mark, J., Mandel, P.:
Effects of di-n-propyl-acetate, an anticonvulsive compound, on GABA metabolism.
Neurochem 16, 869-873, 1969

Gram, L., Flachs, H., Würzt-Jørgensen, A., Parna, J., Andersen, B.:
Sodium Valproate, serum level and clinical effect in Epilepsy: A controlled study.
Epilepsia 2o, 3o3-312, 1979

Groh, C., Rosenmayr, FW.:
Austrian multicenter-study about dipropylacetate (Convulex^{R}) -experiences in childhood epilepsies.
Österreichische Verbundsstudie über Dipropylacetat (Convulex^{R})-paediatrische Erfahrungen.
Paediatr Paedol 11, 178-185, 1976

Gugler, R., Schell, A., Eichelbaum, M., Fröscher, W., Schulz, HU.:
Disposition of Valproic acid in man.
Europ J clin Pharmacol 12, 125-132, 1977

Gugler, R., Müller, G.:
Plasma protein bindings of valproic acid in healthy subjects and in patients with renal disease.
Br J clin Pharmac 441-446, 1978

Gugler, R., von Unruh, G.E.:
Clinical Pharmacokinetics of Valproic acid.
Clinical Pharmacokinetics 5, 67-83, 198o

Haigh, D., Forsythe, WI.:
The treatment of childhood epilepsy with sodium valproate.
Dev Med Child Neurol 17, 743-748, 1975

Harvey, PKP., Bradford, HF., Davidson, AN.:
The inhibitory effect of sodium n-dipropylacetate on the degradative enzymes of the GABA shunt.
FEBS Lett 52, 251-254, 1975

Harwood, G., Harvey, PKP.,:
Results of a clinical trial on the use of Epilim in convulsive disorders, with a special reference to its efficacy in temporal lobe attacks with focal features.
In: clinical and pharmacological aspects of sodium valproate (Epilim) in the treatment of Epilepsy, Hrsg NJ Legg, MCS Consultants, Tunbridge Wells 4o-43, 1976

Hassan, M.N., Laljee H.C.K., Parsonage, M.J.:
Experience in the treatment of resistant cases of epilepsy with sodium valproate (Epilim).
In: clinical and pharmacological aspects of sodium valproate (Epilim) in the treatment of Epilepsy, Hrsg NJ Legg, MCS Consultants, Tunbridge Wells 4o-43, 1976

Hulshoff, JAM., Schobben, F., van der Kleijn, E.:
The interactions of 2-propyl pentanoate with phenobarbital and with phenytoin in rat.
Pharm Weekbl 112, 326-329, 1977

Jeavons, Pm., Clark, JR.:
Sodium valproate in treatment of epilepsy.
Br Med J 2, 584-586, 197o

Johanessen, S.:
Preliminary observations on valproic acid kinetics in patients with epilepsy.
Arzneim Forsch 27, 1o83-1o85, 1977

Jordan, BJ., Shillingford, JS., Steed, KP.:
Preliminary observation on the protein-binding and enzyme-inducing properties of sodium valproate (Epilim).
In: Clinical and pharmacological aspects of sodium valproate (Epilim) in the treatment of epilepsy Hrsg Legg NJ: MCS consultants, Tunbridge Wells, 112-118, 1976

Kaiser, R.:
Chromatographie in der Gasphase, 1. Gas-Chromatographie
B.I. Wissenschaftsverlag Mannheim, 22o S., 1973

Ketz, E.:
Neue Entwicklungen auf dem Gebiet der antiepileptischen Pharmakotherapie.
In: Epilepsie. Therapie-Indikation, neue Antiepileptika, Therapieresistenz, Hrsg R. Kruse, Thieme, Stuttgart 1971

Klotz, U.,:
Pharmacokinetic studies with valproic acid in man.
Arzneim Forschung 27, 1o85-1o88, 1977

Klotz, U.: Klinische Pharmakokinetik, Gustav Fischer Verlag Stuttgart, 111 S., 1978

Köhler, GK.:
Epilepsie-Behandlung mit Ergenyl: Indikation, Wirkungsweise, Nebenwirkungen.
Labaz Erfolg durch Forschung H 1, 1975

Kruse, R.: Zusammenfassung und Diskussion der klinischen Erfahrungsberichte über DPA
In: Epilepsie. Therapie-Indikation, neue Antiepileptika, Therapie-Resistenz, Hrsg. R. Kruse, Thieme, Stuttgart 1971

Kruse, R.,
Symposion on dipropylacetic acid.
Frankfurt, April 26-27, 1974. Labaz GMBH Pharmazeutische Präperate, Düsseldorf

Kugler, J., Knoerl, G., Empt, J.:
Behandlung therapieresistenter Epilepsien mit Dipropylacetat.
Münch Med Wochenschr 115, 1103-1108, 1973

Kugler, J., Empt, J.:
Übersicht über die publizierten Erfahrungen mit Ergenyl .
Labaz Erfolg durch Forschung H 1 65, 1974

Lance, J.W., Anthony M.:
Sodim valproate and clonazepam in the treatment of interactable epilepsy.
Arch Neurol 34, 14-17, 1977

Loiseau, P., Brachet, A., Henry, P.:
Concentrations of dipropyl-acetate in plasma.
Epilepsia 16, 609-615, 1975

LKB Instruction Manual GC/MS-2091

Löscher, W.:
Serum protein binding and pharmacokinetics of Valproate in man, dog, rat and mouse.
J Pharmacol Exp Ther 204, 255-261, 1978

Malek, F., MamoliB., Pateisky, K.:
Die Wirkung von Dipropylacetat (Convulex^{R}) bei Epilepsien mit hoher Anfallsfrequenz im Erwachsenenalter.
Wien Klin Wochenschr 88, 756-760, 1976

Matthes, A., Schmutterer, J.:
Klinische Erfahrungen mit Dipropyl-azetat (DPA).
In: Epilepsie, Hrsg. Georg Thieme, Stuttgart, 57-60, 1971

Matthes, A., Schmutterer, J.:
Klinische Erfahrungen mit einem neuen Antiepiliptikum: Dipropylessigsäure.
Dtsch Med Wochenschr 96, 63-66, 1971

Matthes, A.:
Epilepsie, Diagnostik und Therapie in Klinik und Praxis.
3. Auflage Thieme, Stuttgart, 1977

Meijer, JWA.:
Die Bioverfügbarkeit von DPA-Tabletten, Dragees, Retard-Dragees und Suppositorien.
Workshop über die klinische Pharmakologie von Dipropylacetat, Düsseldorf 9.-1o.7.1976

Meinhardi, H.:
Clinical trials of antiepileptic drugs.
Psychiatr Neurol Neurochir 74, 141-151, 1971

Meinhardi, H., Magnus, O.:
Drug therapy. Clinical application.
In: Handbook of clinical neurology, Hrsg Vinken PJ, Bruyn GW.
Vol 15, North-Holland Publ. Amsterdam, 1974

Meunier, H., Carraz, G., Meunier, Y. Eymard, Pl, Aimard, M.:
Proprietes pharmacodynamiques de l´acide n-dipropylacetique,
Therapie 18, 435-438, 1963

Millard, BJ.:
Quantitative Mass Spectrometry , Heyden Verlag London, 1978

Mortel, I., van de Franck, G.:
Etude pharmacokinétique du di-n-propyl-acétate de sodium sous ses formes ordinaires et retard.
Acta neurol belg 76, 165, 1976

Oelkers, W., Stoffels, G., Schäfer, H., Reith, H.:
Zur enteralen Resorption der Valproinsäure.
Arzneim Forsch 27, 1o88-1o9o, 1977

Organikum:
Organisch chemisches Praktikum.
VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, S. 518, 52o, 6oo, Berlin 1977

Osborn, JA., Jardine, FH., Young, JF., Wilkinson, G.:
The preparation and properties of Tris (triphenylphosphine) halogene-rhodium (I) and some reactions thereof including catalytic homogenous hydrogenation of olefines and acetylenes and ther derivatives.
J. Chem. Soc. 1711-1732, 1966

Patel, IH., Levy, RH.:
Valproic acid binding to human serum albumin and determination of free fraction in the presence of anticonvulsants and free fatty acids.
Epilepsia 2o, 85-9o, 1979

Penin, H.,:
Ergenyl. Ein neues Antiepileptikum. Pharmakologie und Klinik.
Vortrag. Kolloquium über Klinik und Therapie der Anfallskrankheiten.
Berlin 15.12.1973

Penin, H., Köhler, GK.,:
Behandlungsresultate mit Ergenyl.
Vortrag Arbeitstagung über Indikationen, Dosierungen und Nebenwirkungen von Ergenyl.
Frankfurt, 26.-27.4.1974

Perrucca, E., Gatti, G., Frigo, GM., Crema, A., Calzetti, S., Visitini, D.:
Disposition of sodium valproate in epileptic patients.
Br J Clin Pharmacol 5, 495-499, 1978

Portratz, J., Schulz, HU.:
Protein binding of dipropylacetate (DPA) in human plama.
Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology 294, 9, 1976

Richens, A., Scoular, IT., Ahmad, S., Jordan, BJ.:
Pharmacokinetics and efficacy of Epilim in patients receiving long-term therapy with other antiepileptic drugs.
In clinical and pharmacological aspects of sodium valproate (Epilim)

in the treatment of epilepsy
Hrsg Legg NJ, Mcs Consultants, Tunbridge Wells, 78-88, 1976

Ritz, A., Jacobi, G.:
Zur Behandlung kindlicher Epilepsien mit Dipropylessigsäure (DPA).
Fortschr Med 91, 59o-596, 1973

Sawaya, NCB, Horton, RW., Meldrum, BS.:
Effect of anticonvulsant on the cerebral enzymes metabolizing GABA.
Epilepsia 16, 649-655, 1975

Schäfer, J., Kettner, I.:
Erfahrungen mit Dipropylacetat in der Behandlung therapieresistenter erwachsener Anfallskranker.
Med Welt 25, 561-563, 1974

Schlack, H.G.:
Zur antikonvulsiven Behandlung mit Ergenyl.
Therapiewoche 24, 4316-4322, 1974

Schlenk, H., Gellermann, JL.:
Esterification of Fatty acids with Diazomethan on a Small scale.
Analytical Chemistry 32, 1412-1414, 196o

Schobben, F., van der Kleijn, E., Gabreels, FJM.:
Pharmacokinetics of di-n-propylacetate in epileptic patients.
Europ J clin Pharmacol 8, 97-1o5, 1975

Schulz, H.U., Fröscher, W., Gugler, R., Eichelbaum, M.:
Untersuchungen zum "therapeutischen Bereich der Valproinsäure".
Med Welt 3o, 59-61, 1979

Schweizer, Chr.:
Klinische Erfahrungen mit Ergenyl,
Labaz H. 3, 1973

Scollo-Lavizzari, G., Corbat, F.:
A clinical note on a new antiepileptic: "Depakine".
Europ Neurol 4, 312-317, 197o

Seibl, J.:
Massenspektrometrie
Akademische Verlagsgesellschaft, 1974

Simler, S., Ciesielski, L., Maitre, M., Randrianarisoa, H., Mandel, P.:
Effect of sodium n-dipropylacetate on audiogenic seizures and brain gamma-aminobutyric acid level.
Biochem Pharmacol 22, 17o1-17o8, 1973

Simon, D., Penry, JK.:
Sodium n-dipropylacetate (DPA) in the treatment of epilepsy.
Epilepsia 16, 549-573, 1975

Spiteller, G.:
Massenspektrometrische Strukturanalyse organischer Verbindungen.
Verlag Chemie, 1966

Suzuki, M., Mauana, H., Ishibashi, Y., Seki, T., Hoshino, M., Maekawa, K., Yogo, T., Sato, Y.:
A double-blind comparative trial of sodium dipropylacetate and ethosuximide in epilepsy in children, with special emphasis on pure petit mal seizure.
Med Prog 82, 47o-488, 1972

Völzke, E., Doose, H.:
Dipropylacetate (Depakine, Ergenyl) in the treatment of epilepsy.
Epilepsia 14, 185-193, 1973

Waller,
Biochemical applications of mass spectrometry.
Wiley interscience, New York, 872 S., 1972

Herrn Prof. Dr. med. Dengler danke ich herzlich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für sein förderndes Interesse am Verlauf dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. G.E. v. Unruh für seine Hilfe bei der Durchführung dieser Arbeit und seine ständige Bereitschaft, die dabei aufgetretenen Probleme zu diskutieren.

Herrn Dr. Hoffmann, Neurol. Klinik Bonn, danke ich für seine Hilfe bei der Auswahl der an dieser Studie beteiligten Patienten sowie für die Durchführung der klinischen Versuche.

L E B E N S L A U F

Am 15.04.1951 wurde ich als Tochter des Dr. med. Günther Jancik und seiner Frau Charlotte Jancik, geb. Schmidt, in Bochum geboren.

Von 1957 bis 1961 besuchte ich die Friederika-Grundschule in Bochum, wechselte dann zum Schiller-Gymnasium in Bochum über und bestand dort am 24.05.1971 mein Abitur.

Im Wintersemester 1971/72 begann ich mein Medizinstudium an der Ruhr-Universität Bochum.

Während des Studiums studierte ich an den Universitäten Bochum, Aachen und Bonn.

Die ärztliche Vorprüfung legte ich 1974 in Bochum und das dritte Staatsexamen 1978 in Bonn ab.

Meine Approbation als Arzt erhielt ich am 23.05.1978. Im Juli 1978 begann im Labor von Prof. Dr. med. Dengler die vorliegende Arbeit.

Seit Juli 1979 arbeite ich als wissenschaftliche Assistentin an der medizinischen Universitätsklinik, Bonn, Direktor: Prof. Dr. med. Dengler.